



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Judith FILLAUX

le mardi 17 décembre 2013

Titre :

Evaluation de la sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* et du portage persistant
comme facteurs de détérioration de la fonction respiratoire des patients
atteints de mucoviscidose au CHU de Toulouse

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

UMR 152

Directeur(s) de Thèse :

Pr Jean-François MAGNAVAL

Jury :

Bernard PIPY, Directeur de Recherche INSERM, Toulouse - PRESIDENT

Jean-Philippe BOUCHARA, Professeur des Universités, Angers - RAPPORTEUR

Stéphane RANQUE, Maître de Conférence des Universités, Marseille - RAPPORTEUR

Laurence DELHAES, Maître de Conférence des Universités, Lille - EXAMINATEUR

Jean-François MAGNAVAL, Professeur des Universités, Toulouse - EXAMINATEUR

François BREMONT, Docteur en Médecine, Toulouse - MEMBRE INVITE



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Judith FILLAUX

le mardi 17 décembre 2013

Titre :

Evaluation de la sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* et du portage persistant
comme facteurs de détérioration de la fonction respiratoire des patients
atteints de mucoviscidose au CHU de Toulouse

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

UMR 152

Directeur(s) de Thèse :

Pr Jean-François MAGNAVAL

Jury :

Bernard PIPY, Directeur de Recherche INSERM, Toulouse - PRESIDENT
Jean-Philippe BOUCHARA, Professeur des Universités, Angers - RAPPORTEUR
Stéphane RANQUE, Maître de Conférence des Universités, Marseille - RAPPORTEUR
Laurence DELHAES, Maître de Conférence des Universités, Lille - EXAMINATEUR
Jean-François MAGNAVAL, Professeur des Universités, Toulouse - EXAMINATEUR

François BREMONT, Docteur en Médecine, Toulouse - MEMBRE INVITE

Remerciements

Au président du jury,

Monsieur le Docteur Bernard PIPY,

Directeur de Recherche

UMR 152, Equipe MRN2i

Merci de m'avoir reçu et acceptée dans votre équipe alors que je ne faisais pas de biologie mais de l'épidémiologie. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury et d'en être le président. Votre enthousiasme pour la recherche est très communicatif et j'espère que notre collaboration pourra se poursuivre au-delà de ce travail.

Aux rapporteurs,

Monsieur le Professeur Jean Philippe BOUCHARA

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Et

Monsieur Stéphane RANQUE

Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et de m'avoir permis de le soutenir. Merci d'être venus jusqu'à Toulouse, où les discussions autour de ce sujet ont été riches en enseignements. En espérant pouvoir continuer nos discussions et entamer une collaboration scientifique.

Aux membres du jury,

Madame le Docteur Laurence DELHAES

Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier

Merci d'être venue jusqu'à Toulouse pour participer à ce jury. Merci pour ton enthousiasme et ta confiance. Je suis, maintenant, prête et disponible pour d'autres aventures fongiques et mucoviscidosiques !

Monsieur le Professeur Jean François MAGNAVAL

Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier

*Merci pour vos conseils et votre patience au long de ce difficile parcours.
Ne dit on pas que la répétition est la base de la pédagogie ?
J'espère ne pas avoir été trop mauvaise élève.
Merci encore pour m'avoir fait confiance et permis d'en arriver là.*

Monsieur le Docteur François BREMONT

Praticien Hospitalier

Merci de m'avoir confié tes patients et d'avoir été engagé dans ce travail. Une nouvelle ère s'ouvre devant nous, avec de nouvelles collaborations qui je l'espère seront aussi agréables et fructueuses.

Merci à ma petite famille, Guillaume pour sa patience (eh oui, 7 ans de thèse, c'est long !), Thibault qui se demande si tout le monde doit travailler autant... et Clément qui pour l'instant ne se pose pas trop de questions mais ça va venir.

Merci à mes parents et mes beaux parents pour le soutien moral et logistique, indispensable quand on veut faire tout en même temps !

Merci à ma sœur, mon frère et leurs binômes pour les moments de détente familiales. Merci à toute la famille, proche ou lointaine, pour ses marques d'encouragement et de soutien.

Merci à tous les amis, les toulousains, les parisiens, les lyonnais, les docteurs (les vrais, les faux, les doubles...), les sportifs et les chiens pour votre soutien, vos encouragements et vos félicitations. Oui, oui, on fêtera ça dignement mais aux beaux jours...

Merci à Sophie C, pour ta disponibilité, nos discussions (parfois sans queue ni tête), les relectures, les conseils...

Merci à Valérie pour les tentatives de cultures cellulaires... (Pas mon truc !)

Merci à Alexis, Antoine, Bénédicte, Christine, Pamela, Sylvie, Xavier, la route est encore longue et je suis ravie de la partager avec vous.

Merci à Catherine, Elodie et Geneviève pour les déjeuners « détente » (cantine aujourd'hui ?)

Merci aux technicien(ne)s de Parasitologie – Mycologie pour leur accueil, le chemin parcouru et à venir...

Merci à Agnès, Hélène et l'équipe MRN2i à laquelle je m'efforce d'appartenir !

Merci aux équipes du CRCM et à leurs patients, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Et à tous ceux que j'ai oublié, MERCI

Table des matières

Introduction	8
Aspergillus fumigatus	10
1. Agent pathogène	10
1.1 Généralités	10
1.2 Manifestations cliniques	10
Figure 1 : Manifestations cliniques dues à <i>A. fumigatus</i>	11
1.3 Diagnostic optique	12
Figure 2 : Filaments de « type <i>Aspergillus</i> » à l'examen direct.....	12
Figure 3 : Caractéristiques morphologiques d'une tête aspergillaire.....	14
Figure 4 : Culture d' <i>A. fumigatus</i>	14
Figure 5 : Caractéristiques microscopiques d' <i>A. fumigatus</i>	15
1.4 Immunodiagnostic chez le patient immunocompétent.....	15
Figure 6 : Double diffusion d'Ouchterlony	16
Figure 7 : Electrosynérèse	17
Figure 8 : Immunoélectrophorèse rapide.....	18
2. Mécanismes de pathogénicité	19
2.1 Colonisation et adhérence.....	19
2.2 Croissance fongique et invasion	20
2.3 Propriétés immunomodulatrices.....	21
3. Défense de l'hôte contre <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
3.1 Les défenses non spécifiques.....	22
3.2 Immunité innée	23
3.3 Immunité acquise	27

Mucoviscidose	29
1. Epidémiologie	29
2. Génétique	29
Tableau 1 : Classification fonctionnelle des mutations de la protéine CFTR ⁴⁹	30
3. Diagnostic	30
Encadré 1 : Signes cliniques de la mucoviscidose ⁴⁹	31
Figure 9 : Algorithme pour le diagnostic de la mucoviscidose ⁵¹	32
4. Impact de la maladie sur les mécanismes de défense pulmonaire	34
4.1 Anomalie du surfactant	35
4.2 Inflammation primaire ou anomalie de la réponse immunitaire.....	37
5. Microbiologie du poumon dans la mucoviscidose	40
5.1 Aspects chronologiques des infections bactériennes	40
Figure 10 : Prévalence des infections des voies aériennes en fonction de l'âge ⁵⁷	41
5.2 Pseudomonas aeruginosa	41
5.3 Données mycologiques	42
Figure 11 : Présence fongique et répartition des espèces dans la population étudiée ⁹⁷	43
Aspergillus fumigatus et mucoviscidose	49
1. Aspergillose bronchopulmonaire allergique	49
Tableau 2 : Critères pour le diagnostic de l'ABPA (asthme et mucoviscidose)	50
2. Sensibilisation à <i>Aspergillus fumigatus</i>	50
3. Colonisation à <i>Aspergillus fumigatus</i>	50
Sensibilisation et colonisation par <i>Aspergillus fumigatus</i> au cours de la	
mucoviscidose, au CHU de Toulouse.....	52

1. Impact clinique des maladies aspergillaires.....	52
Article 1 publié dans Scandinavian Journal of Infectious diseases, 2012; 44: 842–847	55
2. Facteurs prédictifs d'une sensibilisation aspergillaire	61
Article 2 accepté dans The Pediatric Infectious Disease Journal, 2013 Dec 11. [Epub ahead of print]	64
Discussion	72
1. Impact clinique des maladies aspergillaires.....	72
2. Facteurs prédictifs d'une sensibilisation aspergillaire	73
Tableau 3 : Comparaison des critères biologiques de classification des maladies aspergillaires.....	76
3. Limites de l'étude	77
3.1 Définition des groupes de patients	77
Tableau 4 : Proposition de définitions de la colonisation et de l'infection à <i>Aspergillus</i> <i>sp.</i> ¹⁷⁶	78
3.2 Choix des méthodes pour le diagnostic immunologique.....	78
3.3 Recueil des données clinico-biologiques	80
3.4 Comparabilité de la population	81
Conclusions	82
Bibliographie.....	84

Introduction

Les champignons filamenteux du genre *Aspergillus sp.* sont saprophytes, cosmopolites et opportunistes. *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus souvent rencontrée en pathologie humaine. *A. fumigatus* est responsable d'un large éventail de maladies touchant exclusivement des patients débilisés. Le plus souvent, la contamination se fait par voie aérienne et le site anatomique privilégié de l'infection est l'arbre respiratoire.

La mucoviscidose est une maladie génétique fréquente, à transmission autosomique récessive. Bien que l'expression clinique de la maladie dépende du type de mutation, les manifestations respiratoires et pancréatiques sont les plus fréquentes et déterminent le pronostic de la maladie. L'épithélium respiratoire des patients atteints de mucoviscidose est défectueux et la réaction de l'hôte est inadaptée aux agressions extérieures. Ces patients sont ainsi sujets, depuis leur plus jeune âge, à des infections respiratoires bactériennes répétées qui deviennent chroniques avec le temps. Alors que la bibliographie concernant les infections bactériennes au cours de la mucoviscidose est abondante, les publications sur le problème posé par les infections fongiques sont plus rares. Les principales données concernant aspergillose et mucoviscidose portent essentiellement sur l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA), maladie pour laquelle il existe maintenant des recommandations de prise en charge et de traitement au cours de la mucoviscidose. Cependant, il a été constaté, chez des patients présentant des signes respiratoires sans qu'une cause soit retrouvée, la présence d'anticorps (IgE et/ou IgG) dirigés contre *A. fumigatus* et/ou la détection d'*A. fumigatus* dans les expectorations sans critères cliniques d'ABPA. Sans aucun argument scientifique, la prescription d'antifongiques s'est étendue, au-delà du diagnostic d'ABPA, à ces patients dont l'état respiratoire se dégradait sans qu'aucune cause infectieuse, autre que la mise en évidence directe ou indirecte d'*A. fumigatus*, ne soit retrouvée.

Au CHU de Toulouse, deux Centres de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose (CRCM), pédiatrique et adulte, suivent les patients de la région Midi-Pyrénées. Leurs médecins implémentent, après consentement, une base de données cliniques et biologiques recueillies à chaque consultation. A partir de ces données recueillies sur une période de 12 ans, une étude a été menée afin de déterminer si le fait de présenter des signes directs et/ou indirects de la présence d'*A. fumigatus*, en l'absence d'ABPA, pouvait être responsable de l'altération de la fonction pulmonaire indépendamment de l'existence d'autres infections bactériennes. Dans un deuxième temps, après avoir identifié deux nouvelles entités morbides, la sensibilisation à *A. fumigatus* et le portage persistant de ce champignon, un algorithme de calcul de risque de survenue de la sensibilisation a été proposé à partir de l'étude des patients pour qui les données avaient été enregistrées dès le diagnostic de mucoviscidose.

Aspergillus fumigatus

1. Agent pathogène

1.1 Généralités

Aspergillus fumigatus est un champignon microscopique saprophyte¹ qui joue un rôle essentiel dans le recyclage du carbone et du nitrogène environnemental. Sa niche écologique est le sol dans lequel il survit et pousse sur les débris organiques. Bien que cette espèce ne soit pas la plus fréquente, elle est la plus ubiquitaire parmi celles comportant des conidies atmosphériques. Les études environnementales indiquent que chaque individu inhale au moins plusieurs centaines de conidies d'*A. fumigatus* par jour. L'inhalation de conidies par un individu immunocompétent n'entraîne que rarement des effets indésirables, les conidies étant éliminées de façon efficace par les mécanismes d'immunité innée. Du fait de l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés et de l'existence de thérapies extrêmement immunosuppressives, la situation a énormément changé durant ces 20 dernières années. *A. fumigatus* est devenu le champignon pathogène à contamination aérienne le plus fréquemment incriminé lors de sévères infections invasives.

1.2 Manifestations cliniques

Pour la plupart des patients, la porte d'entrée ainsi que le site d'infection par *A. fumigatus* sont l'arbre respiratoire. Les différents types de maladies pulmonaires (Figure 1, p11) causées par *A. fumigatus* peuvent être classées en fonction du site de la maladie dans l'arbre respiratoire et de son versant colonisateur/invasif ou allergique, tous ces facteurs étant influencés par l'état immunitaire du patient.²

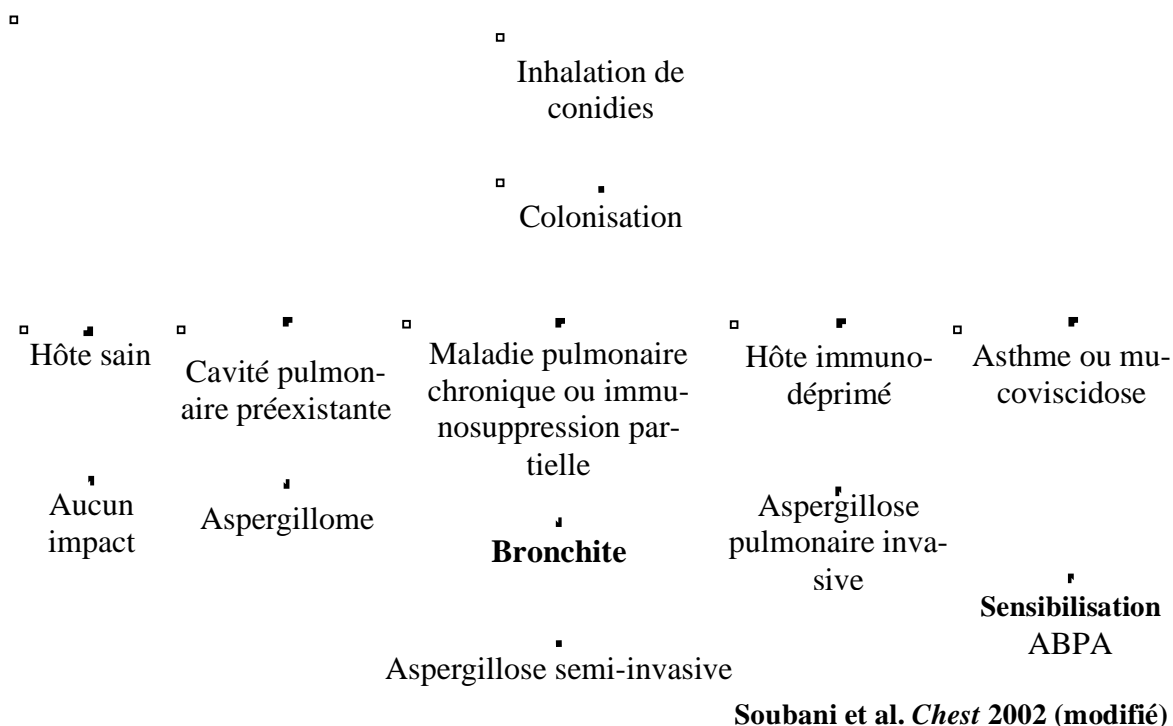


Figure 1 : Manifestations cliniques dues à *A. fumigatus*

L'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) est la plus sévère des maladies allergiques provoquées par *A. fumigatus*. Elle survient chez des patients souffrant d'asthme ou atteint de mucoviscidose. Cette pathologie associe une réaction d'hypersensibilité immédiate avec élévation des immunoglobulines E (IgE) et semi-retardée (présence d'anticorps) liée à une colonisation mycélienne trachéobronchique le plus souvent par *A. fumigatus*. Elle se manifeste, surtout en hiver, par une dyspnée continue asthmatiforme, une toux, une expectoration abondante, parfois hémoptoïque et accompagnée d'une fièvre. Sur la radiographie, il existe des infiltrats pulmonaires uni ou bilatéraux mal limités et variables d'un examen à l'autre. L'évolution est chronique. La destruction progressive du tissu conjonctif conduit à une granulomatose bronchocentrique de pronostic réservé. La réponse immunologique est polyclonale, toutes les classes d'immunoglobulines spécifiques anti-aspergillaires sont impliquées et doivent être recherchées. Les examens complémentaires révèlent une hyperéosinophilie sanguine. Le diagnostic d'ABPA repose sur un faisceau d'arguments associant des critères cliniques, radiologiques, biologiques et immunologiques (Tableau 2, p50).

1.3 Diagnostic optique

- Les prélèvements

Ils peuvent être de diverses natures mais proviennent le plus souvent de l'arbre respiratoire : expectoration, liquide de lavage bronchoalvéolaire, ponction transtrachéale, aspiration bronchique...

- Examen mycologique

Schématiquement, l'identification d'une espèce repose sur des critères macroscopiques (aspect général des colonies) et microscopiques (étude des filaments végétatifs, des organes de fructification et des spores). Certaines données (température, sensibilité au cycloheximide) seront des compléments utiles à l'identification

Examen direct

L'examen direct met en évidence la présence de filaments mycéliens de « type *Aspergillus* » (Figure 2, p12).

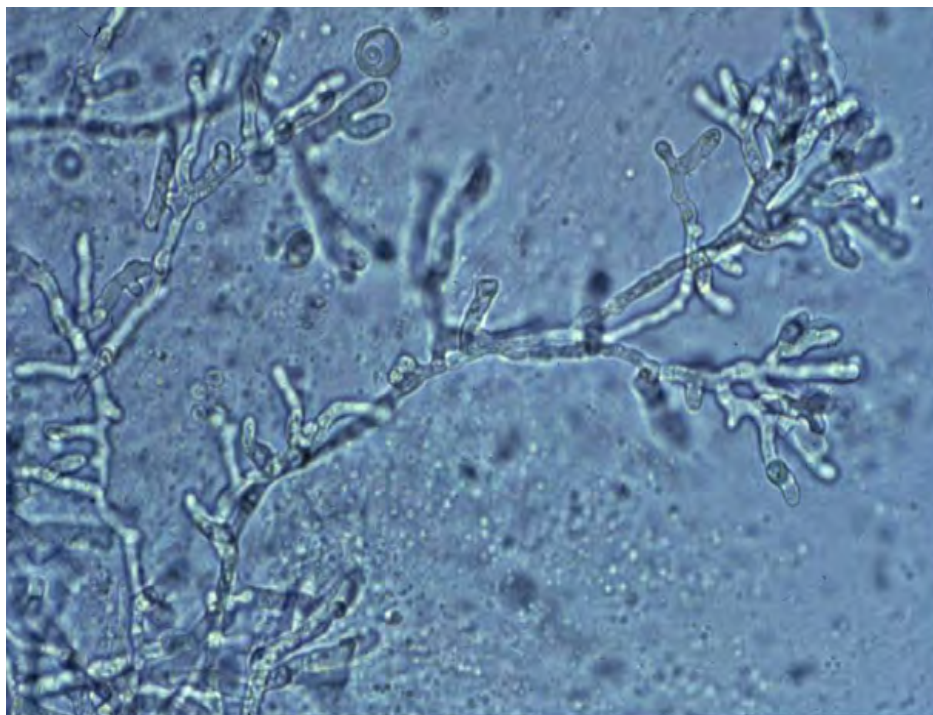


Figure 2 : Filaments de « type *Aspergillus* » à l'examen direct

Entre lame et lamelle, ils mesurent de 3 à 6 μm de diamètre, apparaissent hyalins, réguliers à bords parallèles, septés, et souvent ramifiés (dichotomie avec angles aigus à 45°). La présence de ces filaments permet d'affirmer le caractère pathogène du champignon.^{3,4}

Culture

Les *Aspergillus sp.* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. L'identification du genre *Aspergillus* reposera sur la mise en évidence des têtes aspergillaires (Figure 3, p14) à l'examen microscopique des colonies obtenues après mise en culture du prélèvement. Sur les filaments végétatifs, prennent en effet naissance des filaments dressés, non cloisonnés. Ces derniers, qu'on appelle conidiophores, se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. La conidiogenèse s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides d'une série de spores ou conidies qui restent accolées les unes aux autres en chaînes non ramifiées, basipètes, la plus jeune étant à la base de la chaîne. Les spores, toujours unicellulaires, sont de formes variables, globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques. Diversement pigmentées, elles peuvent être lisses ou recouvertes d'aspérités plus ou moins marquées. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées), ou portées par des petits articles insérés sur la vésicule, les métules (têtes bisériées). L'ensemble vésicule, phialides et conidies constitue la tête aspergillaire qui caractérise le genre *Aspergillus*.

Les *Aspergillus sp.* se développent habituellement bien sur les milieux classiques de mycologie comme le milieu de Sabouraud. Si nécessaire, leur fructification peut être stimulée par repiquage de la colonie sur gélose au malt ou sur milieu de Czapek qui constituent les milieux de référence pour ces champignons. Après 24 à 48 heures de culture, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. C'est avec la maturation des structures conidiogènes (48 à 96 heures selon les espèces) que ces colonies vont prendre leur teinte carac-

téristique, brune, verte, jaune, ou noire selon les espèces. La couleur de la culture (Figure 4, p14) oriente rapidement le diagnostic d'espèce. Enfin, les *Aspergillus sp.* poussent à 22-25°C et à 37°C pour les espèces thermophiles.

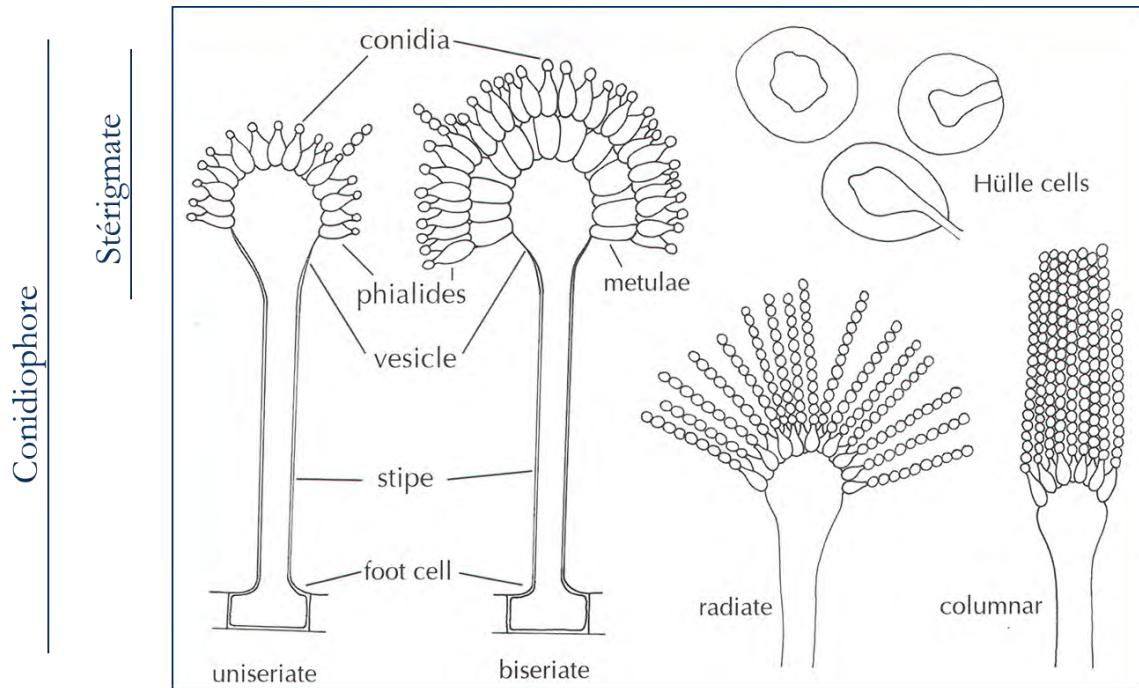


Figure 3 : Caractéristiques morphologiques d'une tête aspergillaire

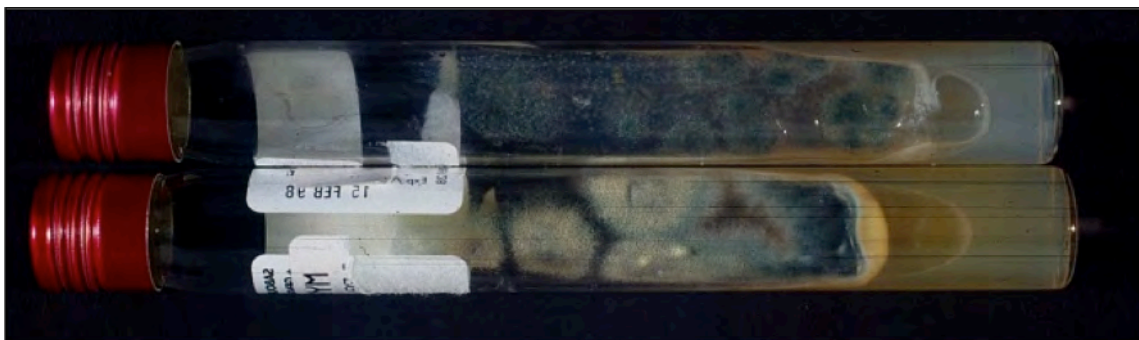


Figure 4 : Culture d'*A. fumigatus*

Identification

L'identification d'espèce est basée sur la morphologie des conidies et du conidiophore (Figure 5, p15).¹ Dans le cas d'*A. fumigatus*, les conidies sont vertes, de 2,5 à 3 µm de diamètre, produites en chaîne à partir de phialides basipètes verdâtres de dimension 6 à 8 sur 2 à 3 µm. Les phialides naissent directement de la vésicule (20 à 30 µm de diamètre), sans rangée de métules. *A. fumigatus* est un champignon à pousse rapide, la taille de la colonie atteint 4 ± 1 cm en une semaine sur milieu agar Czapek à 25°C.

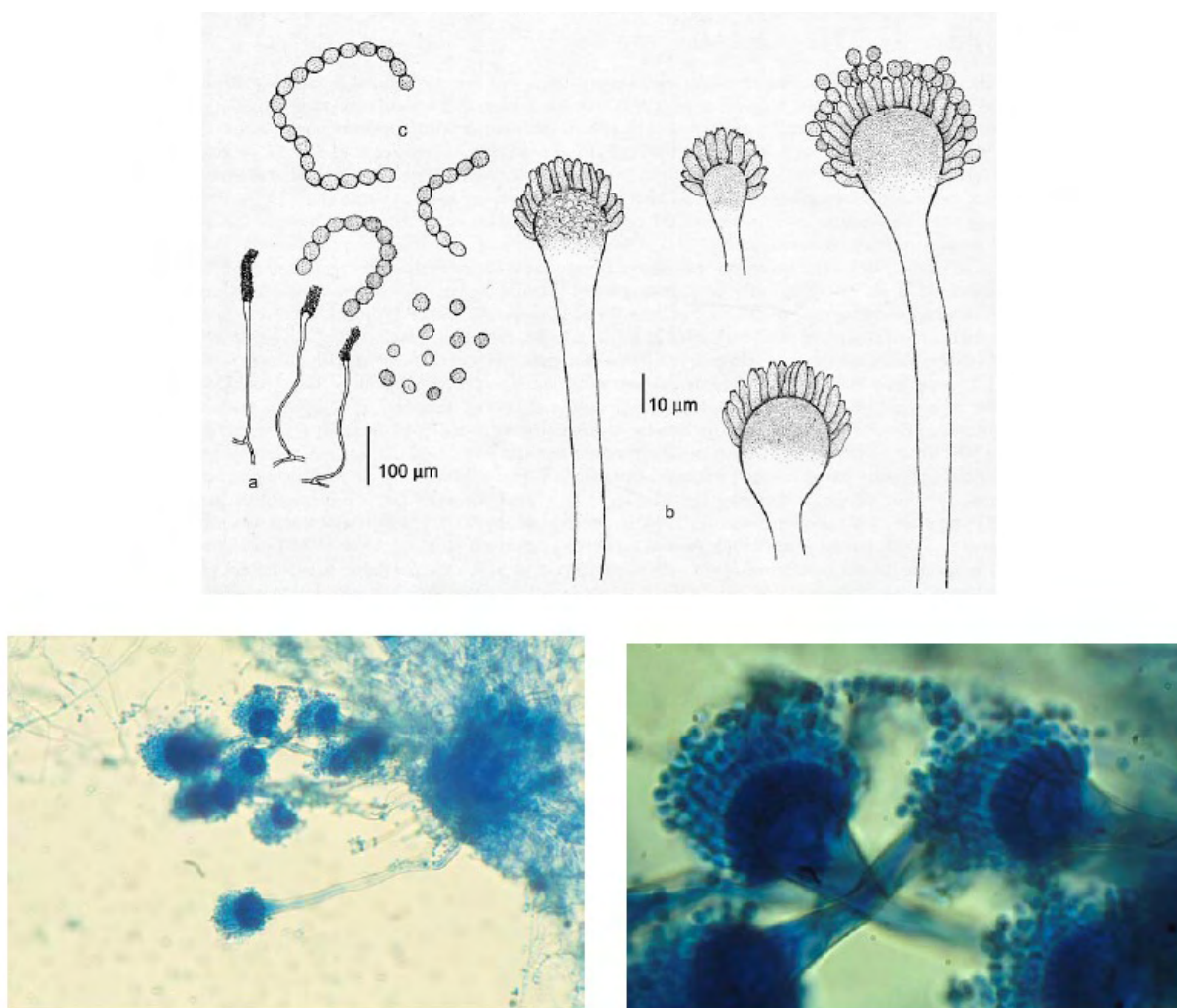


Figure 5 : Caractéristiques microscopiques d'*A. fumigatus*

1.4 Immunodiagnostic chez le patient immunocompétent

La détection des anticorps sériques dirigés contre les antigènes d'*A. fumigatus* peut être d'une grande aide dans le diagnostic des maladies aspergillaires de l'immunocompétent.^{5,6} Alors que la croissance du champignon en culture peut être limitée, une importante réponse humorale est fréquemment observée.^{1,7} La recherche de précipitines dirigées contre les antigènes somatiques ou métaboliques est un examen clé. De nombreuses méthodes ont été développées mais l'immunodiffusion et l'immunoélectrophorèse sont les deux méthodes les plus utilisées dans les laboratoires d'analyses médicales. La détection d'une activité enzymatique (arc catalasique ou arc chymotrypsique) peut y être associée. Ces deux méthodes sont simples et de coût modéré. Elles ont l'avantage de présenter peu de faux positifs mais l'inconvénient de ne

pas quantifier la réponse immune et d'être peu standardisées du fait de l'utilisation d'extraits bruts d'*A. fumigatus*.

- Les techniques d'immunoprécipitation^{5,8}

Ces méthodes - Ouchterlony ou double diffusion en gélose, électrosynérèse, et immunoélectrophorèse - utilisées depuis plus de 40 ans pour le diagnostic des mycoses sont toujours d'actualité.

Double diffusion d'Ouchterlony

Cette technique est réalisée sur un support (lame porte-objet ou petite boîte de Pétri) recouvert d'un gel d'agarose. Les antigènes et le sérum, déposés dans des puits proches, diffusent dans la gélose pendant 24 à 48 heures (Figure 6, p16). La présence d'anticorps sériques se traduit par l'apparition d'un ou plusieurs arcs de précipitation situés dans la zone de gel séparant les deux puits. Ces arcs sont visualisés par une coloration du gel, souvent par Bleu de Coomassie. Cette méthode qualitative a comme inconvénient de fournir un résultat tardif (4 à 5 jours) et d'exiger une quantité importante d'antigène.

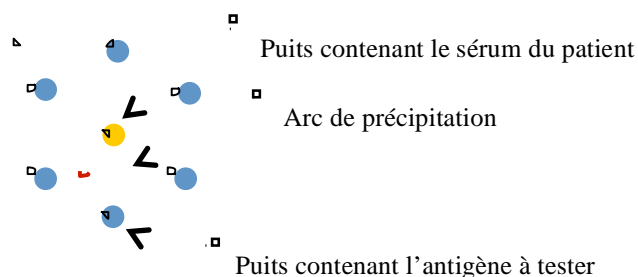


Figure 6 : Double diffusion d'Ouchterlony

Electrosynérèse

Cette technique consiste à faire migrer dans un champ électrique antigènes et anticorps, ce qui accélère la migration. Les anticorps chargés positivement migrent vers la cathode et les antigènes chargés négativement vers l'anode (Figure 7, p17). Une réaction positive se traduit par la détection d'un ou plusieurs arcs de précipitation. Elle peut être réalisée sur gel d'agarose ou sur une membrane d'acétate de cellulose. C'est une méthode qualitative, sensible et rapide.^{9,10}

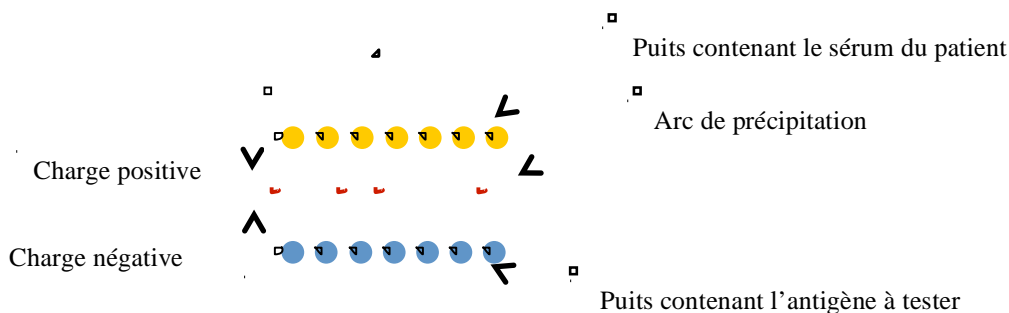


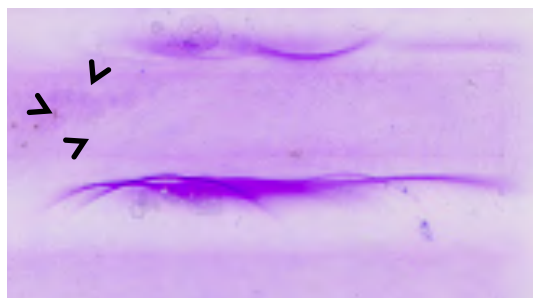
Figure 7 : Electrosynérèse

Immunoélectrophorèse

Cette technique, combine l'électrophorèse de la suspension antigénique à une double diffusion dans la gélose des antigènes et des anticorps. L'interprétation repose sur le nombre et la position des arcs de précipitation, leur forme et épaisseur (Figure 8, p18). Elle est moins sensible que les méthodes précédentes,¹¹ mais spécifique car elle permet une analyse qualitative et une localisation des arcs de précipitation. Elle a comme inconvénient d'avoir un délai de réponse long. Une modification de la méthodologie, l'immunoélectrophorèse rapide (IER), a amélioré ce délai.¹² La présence d'arcs de précipitation doit être complétée par la révélation d'arcs à support d'activités enzymatiques catalasique et/ou chymotrypsique.¹³

Au CHU de Toulouse, l'IER avec caractérisation de l'activité catalasique¹² est la méthode de référence pour la mise en évidence d'anticorps dirigés contre les antigènes d'*A. fumigatus*. Son utilisation depuis de longues années chez les patients atteints de mucoviscidose, a montré qu'au-delà de trois, le nombre d'arc de précipitation avait une signification clinique même en l'absence de l'activité catalasique.^{14,15} Lors de réactions faiblement positives (1 à 2 arcs), l'identification d'une activité enzymatique catalasique affirme le diagnostic d'infection aspergillaire.

Sérum du patient

Antigènes somatiques
Aspergillus fumigatus

Arcs spécifiques

Antigènes métaboliques
Aspergillus fumigatus

Figure 8 : Immunoélectrophorèse rapide

- Les autres techniques de dépistages^{5,16}

Hémagglutination passive

Elle détermine de façon quantitative la présence d'anticorps sériques dirigés contre *A. fumigatus*. La présence d'anticorps spécifiques entraîne une agglutination d'hématies sensibilisées (recouvertes par un antigène d'*Aspergillus sp.*). Le principe de la technique consiste à introduire les sérums des patients, testés à différentes dilutions, et les témoins, positif et négatif, dans les cupules de microplaques en présence des hématies sensibilisées. La lecture se fait après incubation des plaques. Une réaction positive (agglutination) se traduit par la formation d'un voile au fond de la cupule, tandis que l'absence de réaction se traduira par la formation d'un anneau de sédimentation. Cette technique a l'avantage d'être sensible et de réalisation rapide et facile.^{17,18} Mais cette réaction manque de spécificité.¹¹ Elle est utilisée comme technique de dépistage.

Immunofluorescence indirecte

Les sérums de patients, à différentes dilutions, ainsi que des témoins, positif et négatif, sont mis en contact avec des coupes d'organes d'animaux infectés par *A. fumigatus* et fixés dans des puits sur une lame. La réaction antigène-anticorps est révélée par un substrat fluorescent après incubation. Elle demande un certain équipement (microscope à fluorescence) et elle est de mise en œuvre assez délicate (réactifs non commercialisés). Elle est sensible et spécifique.¹¹ Elle est utilisée comme technique de dépistage.

ELISA

Il s'agit d'une technique indirecte immunoenzymatique en phase solide. Dans un premier temps, le sérum du patient est déposé dans les cupules recouvertes d'antigène aspergillaire. Si le sérum contient des anticorps spécifiques IgG dirigés contre *A. fumigatus*, ceux-ci vont se fixer sur l'antigène. Après lavage, une globuline anti-IgG humaine est déposée dans les cupules et réagit en formant un complexe avec les anticorps liés à l'antigène. Après lavage des cupules, un substrat est ajouté. En présence du conjugué lié aux anticorps spécifiques anti-*A. fumigatus*, le substrat est hydrolysé en un produit coloré ou fluorescent. La mesure de l'absorption ou de la fluorescence est convertie par l'automate en concentration. Un seuil de positivité est déterminé en fonction des trousse commercialisées.⁵ La sensibilité et la spécificité de l'ELISA varient beaucoup en fonction des antigènes utilisés,^{7,19-21} la sensibilité reste toutefois plus élevée que celle des techniques d'immunoprécipitation ou d'immunofluorescence.²²⁻²⁶

2. Mécanismes de pathogénicité

Toutes les espèces d'*Aspergillus sp.* ne sont pas pathogènes pour l'homme et moins d'une dizaine sur les 300 espèces répertoriées représentent un réel risque infectieux. Ainsi, il est indispensable pour le champignon de posséder des caractères physico-morphologiques adaptés à la colonisation, des facteurs d'adhérence aux cellules pulmonaires et enfin des facteurs de virulence afin de pouvoir exprimer son pouvoir pathogène à divers degrés.²⁷

2.1 Colonisation et adhérence

La petite taille des spores aspergillaires (2 à 5 µm de diamètre) permet leur pénétration dans les voies respiratoires profondes et les alvéoles pulmonaires. La thermotolérance des souches aspergillaires favorise la colonisation de l'arbre trachéobronchique. Leur développement est possible grâce à leur capacité à filamento in vivo et à leur pouvoir d'adhésion à l'épithélium

bronchique. Les mécanismes moléculaires d'adhésion d'*A. fumigatus* aux cellules de l'hôte sont mal connus. La composition de la paroi cellulaire d'*A. fumigatus* a été étudiée et cette dernière semble jouer un rôle clé dans la relation entre l'hôte et le pathogène. Les premières études ont ciblées préférentiellement l'identification de protéines comme molécules d'adhésion mais plus récemment il est apparu que les glycanes jouaient un rôle primordial dans l'adhérence du champignon aux cellules de l'hôte.²⁸ La première protéine mise en évidence comme jouant un rôle dans l'adhérence était l'hydrophobine RodA, présente sur les conidies d'*A. fumigatus*. Cette hydrophobine aurait un rôle immunomodulateur en évitant la reconnaissance du β 1,3-glucan par les cellules immunitaires de l'hôte.²⁹ Le rôle des autres hydrophobines reste inconnu à ce jour. D'autres études ont également décrit la présence sur les conidies de récepteurs pour la laminine, d'une part, et pour le complément, d'autre part, capables de se lier à différentes protéines des cellules de l'hôte (fibrinogène, complément, laminine...). Une de ces protéines a été identifiées comme étant l'allergène d'*Aspergillus sp.* AspF2.³⁰ Le rôle d'AspF2 dans l'adhésion à la laminine a été démontré *in vitro* mais son rôle dans l'adhésion et la virulence *in vivo* reste inconnu. Plus récemment, il est apparu que d'autres composants de la paroi fongique ou de la matrice extracellulaire avaient probablement un rôle dans l'adhésion du champignon aux cellules de l'hôte.²⁸

2.2 Croissance fongique et invasion

Divers métabolites toxiques sont produits lors de la croissance fongique. Ces toxines ont un rôle potentiellement pathogène, comme par exemple la gliotoxine, la RNase, l'hémolysine. Les différentes enzymes produites par le champignon interviennent dans l'invasion tissulaire de l'hôte. De nombreuses études ont démontré une pathogénicité plus prononcée chez les souches d'*Aspergillus sp.* productrices de protéases (élastase, collagénase).

Les catalases jouent également un rôle important notamment de détoxification des peroxydes d'hydrogène produits par les diverses cellules immunitaires. Il existe trois types de

catalases :^{31,32} l'une est produite par les conidies mais ne joue aucun rôle protecteur vis-à-vis des composés oxygénés, les deux autres, qualifiées de lente et de rapide, sont d'origine mycélienne et offrent une protection partielle contre l'activité des leucocytes. Le champignon résiste à l'action des polynucléaires grâce à la catalase lente, facteur de virulence dont l'activité est révélée lors de l'immunoélectrophorèse.

2.3 Propriétés immunomodulatrices

Ces propriétés sont dues à des métabolites, produits aussi bien par les spores que par le mycélium d'*A. fumigatus*. Les hydrophobines, citées plus haut, ont d'abord été étudiées comme facteurs d'adhérence avant de mettre en évidence leurs propriétés immunomodulatrices. La gliotoxine inhiberait la phagocytose par les neutrophiles puis induit leur apoptose par un mécanisme distinct de celui inhibant la phagocytose. La mélanine inhiberait l'acidification du phagolysosome et donc l'élimination des conidies phagocytées par le macrophage.³³ D'autres métabolites secondaires pourraient inhiber l'action des cellules mucociliées entraînant un séjour plus long du champignon à la surface de l'épithélium et favorisant l'invasion par *A. fumigatus*. De nouvelles approches doivent être élaborées afin de prendre en compte, dans une même étude, le caractère multifactoriel de la virulence du champignon ou de sa résistance vis-à-vis de son hôte.¹

3. Défense de l'hôte contre *Aspergillus fumigatus*

Le poumon présente la plus grande surface épithéliale de l'organisme en contact avec l'extérieur. Celle-ci est régulièrement exposée aux agents pathogènes qui pénètrent par inhalation. En effet, la voie d'accès des pathogènes vers le poumon est habituellement l'inhalation. Physiologiquement, un système de défense très élaboré est chargé d'assurer l'intégrité des voies aériennes. Les défenses anti-infectieuses reposent sur la coopération interactive entre deux types d'immunité, l'immunité innée et l'immunité acquise spécifique. Les cellules épi-

théliales tapissant les voies aériennes préviennent de la colonisation microbienne par trois moyens :

- l'élimination physique par les mouvements ciliaires et la toux,
- la présence d'agents antimicrobiens large spectre dans le mucus et,
- le recrutement de cellules phagocytaires et de la réponse inflammatoire.³⁴

3.1 Les défenses non spécifiques

- La barrière mucociliaire

Elle est formée par :

- l'épithélium qui constitue une barrière physique entre le milieu externe et l'intérieur de l'organisme.
- le mucus qui piège les particules inhalées (spores).
- les cils qui expulsent les particules inhalées par la réponse d'éternuement.
- la flore endogène microbienne qui agit en compétition nutritionnelle et peut aussi produire des substances antifongiques.

- Le surfactant

Les alvéoles sont tapissées par une couche continue de cellules épithéliales de deux types (pneumocytes I et II). Le surfactant sécrété par les pneumocytes II s'étale dans la lumière alvéolaire en un film monomoléculaire à l'interface air – liquide. Une fine couche liquidienne appelée hydrophase sépare le surfactant de l'épithélium, on y trouve les macrophages alvéolaires. Le surfactant alvéolaire est constitué de phospholipides (90%) et de protéines (10%), dont les collectines. Le surfactant a un rôle démontré dans les défenses innées anti-*Aspergillus sp.*³⁵ Les collectines du surfactant agglutinent avec les conidies d'*Aspergillus sp.*, formant de larges complexes qui ensuite seront mis à la portée des macrophages alvéolaires.

3.2 Immunité innée

L'intégrité du tractus respiratoire dépend étroitement du système finement régulé des défenses de l'hôte. Le système d'immunité innée protège contre les microorganismes et stimule le système d'immunité adaptative.³⁶ Les composants cellulaires de l'immunité innée comprennent les cellules phagocytaires telles que les polynucléaires neutrophiles ou les macrophages. L'épithélium du corps humain forme une interface entre le milieu interne et l'environnement extérieur. Dans le tractus respiratoire, l'épithélium tapissant les voies aériennes est le premier point de contact avec les substances inhalées telles que les polluants environnementaux, la fumée de cigarette, les allergènes aériens et les microorganismes.³⁴ Récemment, il est devenu évident que les cellules épithéliales des voies aériennes n'avaient pas seulement un rôle de barrière passive, mais contribuaient aussi de manière active au système d'immunité innée.^{34,37} L'épithélium respiratoire détecte l'exposition bactérienne et répond en augmentant ces défenses. Cette réponse consiste en une augmentation de la libération de peptides antimicrobiens dans la lumière des voies aériennes, et de cytokines et chimiokines dans la sous-muqueuse pour enclencher la réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire implique le recrutement de cellules phagocytaires qui éliminent les microorganismes qui ne l'avaient pas été par l'épithélium lui-même, de cellules dendritiques et de lymphocytes qui contribuent à l'activation de la réponse immunitaire adaptative.³⁶

- Au niveau de l'épithélium respiratoire

Les cellules résidentes

Les macrophages alvéolaires résidents constituent la première ligne de défense contre les agents infectieux. En plus de leurs propriétés phagocytaires, ils jouent un rôle prépondérant dans l'orchestration des réponses inflammatoires et immunes en entraînant le recrutement et l'activation locale des cellules qui en sont responsables. Les macrophages intra alvéolaires phagocytent les particules inhalées dont les spores fongiques dormantes (non germées)

d'*Aspergillus sp.*¹ La phagocytose est facilitée par l'adhérence de la cellule macrophagique aux éléments fongiques. Ce phénomène fait intervenir des interactions spécifiques de type ligand – récepteur, de nature lectinique. Le récepteur mannosyl-fucosyl des macrophages reconnaît des chaînes oligo-saccharidiques de la paroi des champignons, conditionnant l'attachement. L'opsonisation par le fragment Fc des IgG et le fragment C3 activé du complément favorise la phagocytose. Après la phagocytose, les enzymes lysosomales des macrophages détruisent le champignon. Les mécanismes cytotoxiques sont voisins de ceux des polynucléaires neutrophiles (production de radicaux libres oxygénés). L'activité phagocytaire et cytolytique est élevée sur les spores dormantes, tandis qu'elle est nulle sur les spores déjà germées. Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes sont attirés par chimiotactisme sur le site de l'infection par de nombreux facteurs de la zone lésée mais aussi par les mannanes pariétaux du champignon. Leurs principales activités sont la phagocytose et la lyse des éléments fongiques. L'activité phagocytaire et cytolytique des polynucléaires neutrophiles, semble à l'inverse des macrophages, plus élevée envers les hyphes aspergillaires.³⁸

Le complément

Le complément est activé directement au contact des parois microbiennes, le cas échéant par le complexe antigène – anticorps, ou encore par l'interaction des carbohydrates microbiens avec la mannose binding protein du plasma.

Le facteur C3b et son produit de dégradation C3bi se déposent à la surface des microorganismes et interviennent dans leur phagocytose. Les fragments C3a et C5a doués de propriétés chimiotactiques et activatrices pour les leucocytes et les mastocytes provoquent la libération de médiateurs proinflammatoires par ces cellules.³⁹

Les éléments solubles interviennent dans le processus d'opsonisation, c'est-à-dire de renforcement de la capacité phagocytaire d'un germe lorsqu'il est recouvert de ces éléments solubles.

Les cytokines

Comme les bactéries, les champignons, en activant les cellules macrophagiques stimulent la production de cytokines, comme l'interleukine 1 (IL-1), le tumor necrosis factor (TNF α), l'interleukine 6 (IL-6) et l'interleukine 8 (IL-8). Ces cytokines produites par la lignée monocyte – macrophage recrutent de nouvelles cellules phagocytaires dans le foyer d'infection.³⁴

Les autres médiateurs

Les agents antimicrobiens, large spectre de peptides, protéines et molécules organiques,³⁴ proviennent en général des cellules sécrétrices retrouvées dans l'épithélium, telles que les cellules séreuses et muqueuses des glandes de la sous-muqueuse. Le composant majeur du mucus des voies aériennes est une grande glycoprotéine mucine, qui donne au mucus ses propriétés viscoélastiques. Bien que ces glycoprotéines n'aient pas montré de rôle antimicrobien propre in vitro, elles contribuent aux défenses naturelles de l'hôte par sa fonction de barrière physique. La concentration en sel du mucus respiratoire est apparemment étroitement contrôlée et pourrait jouer un rôle dans la défense des voies aériennes. Certaines études ont montré qu'une concentration élevée en sel inhibe l'activité antimicrobienne de certains peptides et protéines.⁴⁰

Inhibition de l'immunité innée au niveau de l'épithélium respiratoire

Les polluants aériens tels que l'ozone et le dioxyde d'azote inhibent la capacité des macrophages alvéolaires à phagocyter.³⁴ Les polluants aériens inhibent l'action des cils sans être cytotoxiques pour les cellules épithéliales. Certains polluants influencent la sécrétion de mucus. Si un polluant imite un agent cholinergique ou affecte l'intégrité d'une cellule caliciforme, il en résulte une augmentation de la sécrétion de mucus. Les polluants induisent la sécrétion d'un large panel de cytokines et autres médiateurs dans l'épithélium. La sécrétion d'IL-8 est stimulée par l'ozone, les particules de 10 μm et moins (PM₁₀) comme les spores aspergillaires, la fumée de cigarette. La libération d'IL-6 et de TNF est aussi stimulée par ces

PM₁₀ et l'ozone. Cette libération est associée à la libération de CXCL, de MIP-2 et de RANTES lors de l'exposition à l'ozone. Ces produits ont été mis en cause dans l'inhibition de la phagocytose des bactéries par le macrophage alvéolaire.^{34,41} Les cellules épithéliales pourraient aussi influencer le développement des cellules T vers une activation de la réponse Th2 et une suppression de la réponse Th1, à la suite d'une exposition à l'ozone. L'ozone inhibe la production d'IL-2 et d'IFN- γ , cette inhibition pourrait être médiée par PGE₂. PGE₂ inhibe la production de cytokines Th1, IL-2 et IFN- γ , mais n'affecte pas la production de cytokines Th2, IL-4 et IL-5. La production d'IL-6 stimule la production d'IL-4 et de NO libérés par les cellules alvéolaires de type II et inhibe le développement des cellules Th1 mais pas des cellules Th2. De plus la sensibilité du macrophage alvéolaire à l'IFN- γ peut être altérée, affectant la capacité du macrophage à être activé pour phagocyter et tuer les pathogènes bactériens.

- Le recrutement cellulaire

La deuxième étape de mise en place des défenses immunitaires pulmonaires est le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires au site de l'infection. Cette étape est orchestrée par différents acteurs, parmi lesquels les molécules d'adhésion exprimées à la fois au niveau des cellules inflammatoires et endothéliales sous l'effet de chimiokines. Cet afflux concernera les polynucléaires neutrophiles ainsi que les macrophages et lymphocytes. Une augmentation de l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales sous la dépendance de couples de molécules d'adhésion (intégrines, sélectines) déclenche leur arrêt et leur diapédèse vers le site infectieux. Les cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages) adhèrent aux agents pathogènes soit directement, par l'intermédiaire de récepteurs pour les carbohydrates, soit grâce à l'opsonisation de ces agents infectieux par des anticorps ou par le complément, pour lesquels elles sont également dotées de récepteurs. Il y a ensuite par le mécanisme de bactéricidie, destruction de l'agent pathogène par production d'un certain nombre de composants, en particulier les dérivés de l'oxygène et les ions superoxydes. Parmi les multiples réactions des macro-

phages activés, la sécrétion de l'interleukine 12 (IL-12) est déterminante dans l'initiation de la réponse immune. En effet l'IL-12 active les lymphocytes NK de voisinage, induisant une importante sécrétion d'interféron gamma (IFN γ). Cette deuxième cytokine est un puissant activateur des macrophages dans leur fonction de bactéricidie, et oriente la différenciation des lymphocytes T vers la voie Th1, optimale pour l'élimination des germes intracellulaires.⁴²

- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques interdigitées jouent un rôle clé dans le développement et la régulation de l'induction d'immunité qui peut être initiée par les effecteurs de l'immunité innée puis développée par les cellules de l'immunité adaptative. Elles ont un rôle de sentinelles et sont des cellules présentatrices d'antigènes capables de stimuler des cellules T naïves entraînant une réponse de type Th1 ou Th2, la première étant associée à l'élimination de l'infection fongique.³³ Elles sont activées et se transforment en cellules présentatrices de l'antigène quand les récepteurs présents à leur surface reconnaissent certains motifs antigéniques sur les microorganismes, notamment les mannanes, éléments constitutifs de la paroi des éléments fongiques. Elles expriment alors des molécules de costimulation lymphocytaire (CD 80 et CD 86).⁴² Un des récepteurs présents à la surface des cellules dendritiques mais aussi des macrophages, des neutrophiles et des cellules T, Dectin-1 joue un rôle central dans la défense contre *A. fumigatus*.^{43,44} Le rôle des cytokines Th17 dans la défense contre *Aspergillus* reste à établir. La voie Th17 semblerait prendre le relai de la voie Th1 lorsque celle-ci est inefficace.⁴⁵

3.3 Immunité acquise

L'immunité acquise, contrairement à l'immunité innée, voit ses réponses amplifiées en intensité et en spécificité au fur et à mesure des réintroductions du même antigène dans l'organisme, grâce à la mémoire immunitaire. Ceci est rendu possible par la mobilisation et l'activation des lymphocytes T (réponse cellulaire) et des lymphocytes B (réponse humorale)

de plus en plus spécifiques des antigènes grâce aux cellules présentatrices d'antigènes et aux médiateurs solubles.⁴²

- L'immunité humorale

Elle joue un rôle limité dans la lutte antifongique. Les anticorps spécifiques interviennent surtout sous forme d'immunoglobulines agrégées de la voie classique du système complémentaire et comme opsonines dans la phagocytose. L'immunité humorale intervient également dans le mécanisme de la cytotoxicité dépendante des anticorps.

- L'immunité cellulaire

L'immunité cellulaire antifongique met principalement en jeu les lymphocytes T CD4+. Ils reconnaissent spécifiquement les antigènes du champignon phagocyté, présentés par les macrophages par l'intermédiaire du complexe immun d'histocompatibilité de classe II. Les lymphocytes ainsi activés deviennent des lymphocytes auxiliaires de type 1. Ils produisent de l'interleukine 2 (expansion clonale des LT) et de l'interféron gamma (activation des macrophages).⁴²

Mucoviscidose

1. Epidémiologie

La mucoviscidose est en France la plus fréquente des maladies génétiques graves. Son incidence estimée est de 1/4 700 naissances en France et sa prévalence moyenne de 0,737/10 000 habitants en Europe.⁴⁶ Le sex ratio de la maladie est de une femme pour un homme. La mucoviscidose est une maladie génétique multi-organe caractérisée principalement par une atteinte pulmonaire progressive, une dysfonction pancréatique et un taux élevé de chlore dans la sueur.⁴⁷ La cause de décès la plus fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose est la défaillance respiratoire consécutive à l'infection et l'inflammation pulmonaire chronique.^{47,48} L'atteinte pulmonaire détermine le pronostic et la qualité de vie. Elle est responsable de 90% de la morbidité et de la mortalité. Le pronostic est variable d'un patient à l'autre mais l'atteinte respiratoire et la dénutrition sont les dénominateurs communs. La maladie est fatale à long terme par insuffisance respiratoire chronique. Pour les patients nés dans les années 90's, la médiane de survie prédite est supérieure à 40 ans.⁴⁹

2. Génétique

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas est une maladie génétique fréquente à transmission autosomique récessive. Elle est causée par la mutation du gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) située, notamment, au pôle apical des cellules glandulaires exocrines. La protéine CFTR est assimilée à un canal chlore, dont le dysfonctionnement aboutit à des transferts d'ions défectueux. Ces troubles modifient la qualité du mucus qui devient déshydraté, visqueux et obstructif. La surinfection bactérienne à l'étage bronchopulmonaire est ainsi quasi constante par adhésion des germes à l'épithélium. Les organes touchés sont multiples : poumons, pancréas, vésicule biliaire, trac-

tus génital, intestin et glandes sudoripares. Le gène de cette protéine est situé sur le bras long du chromosome 7. Plus de 1500 mutations ont été identifiées (www.genet.sickkids.on.ca/cftr) mais leur impact fonctionnel n'est connu que pour un petit nombre d'entre elles. Le Tableau 1⁵⁰ (page 30) montre un système de classification des mutations les plus courantes, basé sur leur altération fonctionnelle.⁵¹ L'absence de la phénylalanine en position 508 (Phe508del), mutation de classe II, représente $\frac{2}{3}$ des allèles mutés en Europe et Amérique du Nord. La fréquence des autres mutations varie en fonction de la population mais aucune ne dépasse 5% de la totalité des mutations connues du CFTR.

L'insuffisance pancréatique est étroitement liée aux mutations de classe I à III, cependant la variabilité des autres gènes et l'influence de l'environnement rendent les corrélations génotype-phénotype faibles, particulièrement concernant les manifestations pulmonaires. Les manifestations cliniques de la mucoviscidose peuvent être très différentes entre des patients présentant un génotype identique, même à l'intérieur d'une fratrie. Les polymorphismes du reste du génome peuvent expliquer cette discordance.

	Impact sur le CFTR	CFTR fonctionnel	Exemple de mutation
Classe I	Absence de production de la protéine	Non	Codons stop (Trp1282X, Gly542X) Défaut d'épissage sans production de protéine (711+1G→T, 1717-1G→A)
Classe II	Défaut de transport de CFTR vers la membrane	Non	Phe508del, Asn1303Lys, Gly85Glu, Leu1065Pro, Asp1507, Ser 549Arg
Classe III	Défaut de régulation, CFTR non activé par ATP ou AMP cyclique	Non	Gly551Asp, Ser492Phe, Val520Phe, Arg553Gly, Arg560Thr, Arg560Ser
Classe IV	Réduction du transport de chlore par CFTR	Oui	Ala455Glu, Arg117Cys, Asp1152His, Leu227Arg, Arg334Trp, Arg117His
Classe V	Défaut d'épissage avec production réduite de CFTR normaux	Oui	3849+10kb C→T, 1811+1-6kb A→G, 2789+5G→A

Tableau 1 : Classification fonctionnelle des mutations de la protéine CFTR⁵⁰

3. Diagnostic

Le diagnostic de la mucoviscidose doit se poser devant un enfant ou un adulte qui présentent des signes évocateurs (Encadré 1, p31).⁵⁰ Depuis 2002, la France procède au dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose, décision prise par le ministère de la Santé, qui en a confié la prise en charge à l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handi-

A tout âge

- Antécédents familiaux de mucoviscidose
- Peau salée
- Toux productive
- *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde isolée des sécrétions bronchiques
- Alcalose métabolique hypochlorémique

Néonatal

- Iléus méconial
- Jaunisse prolongée
- Calcification scrotale ou abdominale
- Atrésie intestinale

Jeune enfance

- Infiltrats persistants sur la radiographie thoracique
- Retard de croissance
- Anasarque ou hypoprotéïnémie
- Diarrhée chronique
- Distension abdominale
- Cholestase
- Pneumonie à *Staphylococcus aureus*
- Hypertension intracrânienne idiopathique
- Anémie hémolytique

Enfance

- Pansinusite chronique ou polypose nasale
- Stéatorrhée
- Prolapsus rectal
- Syndrome d'obstruction intestinale distale
- Pancréatite chronique ou récurrente idiopathique
- Maladie hépatique

Adolescence et adulte

- Aspergillose broncho-pulmonaire allergique
- Pansinusite chronique ou polypose nasale
- Bronchiectasie
- Hémoptysie
- Pancréatite récurrente idiopathique
- Hypertension portale
- Retard de puberté
- Azoospermie secondaire à une absence congénitale bilatérale des conduits déférents

caps de l'Enfant (AFDPHE). La technique de dépistage fait appel au dosage sanguin de la trypsine immunoréactive (TIR) et à la recherche des mutations de la protéine CFTR. La TIR est une protéine dont la présence est plus abondante en cas d'anomalie pancréatique pendant la vie fœtale et les premiers mois de vie. Son dosage permet de repérer de 95 à 98% des nouveau-nés atteints de mucoviscidose ; toutefois la spécificité insuffisante du dosage de la TIR (il sélectionne également des enfants qui ne sont pas, dans les faits, atteints par la mucoviscidose) explique la nécessité du couplage à l'analyse moléculaire.

Des algorithmes pour le diagnostic de la mucoviscidose « typique » ou « non typique » ont été publiés par le groupe de travail de l'Union Européenne⁵² (European Union Cystic Fibrosis Diagnostic Working Group) et la fondation américaine pour la mucoviscidose⁵³ (US Cystic Fibrosis Foundation). Les recommandations s'accordent sur le fait que le diagnostic de mucoviscidose se fait sur un faisceau d'arguments

Encadré 1 : Signes cliniques de la mucoviscidose⁵⁰

cliniques associés à la présence de marqueurs biochimiques et/ou de marqueurs génétiques.

Le diagnostic repose sur le test de la sueur puis la mise en évidence des mutations⁵² (Figure 9, p32).

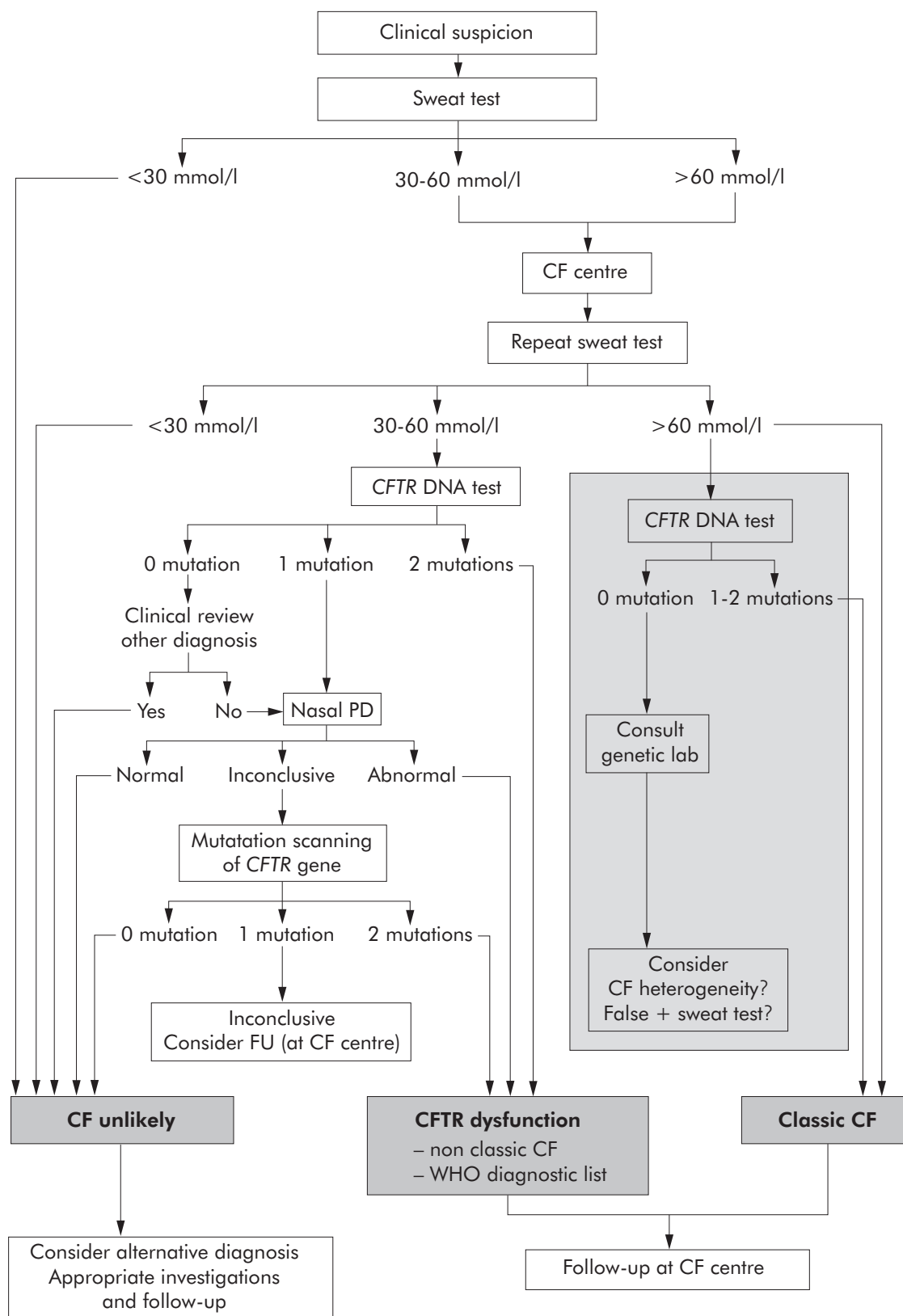


Figure 9 : Algorithme pour le diagnostic de la mucoviscidose⁵²

Le test de la sueur, développé par Gibson et Cooke en 1959,⁵⁴ consiste en un dosage du chlore sudoral par iontophorèse après application de pilocarpine, sur un recueil de plus de 100 mg de sueur. La sudation est provoquée en faisant passer pendant quelques minutes un courant de très faible intensité au travers d'une compresse imbibée de pilocarpine, molécules aux propriétés cholinergiques. Le test est positif si la concentration en chlore est supérieure à 60 mmol/L chez le patient de plus de 6 mois, à deux reprises. Le dépistage néonatal se fait généralement sur une goutte de sang séché, par recherche d'un taux anormalement élevé de trypsine immunoréactive.^{55,56} En cas de positivité ce test sera systématiquement suivi d'un test à la sueur.

La protéine CFTR étant présente à la surface de toutes les cellules épithéliales des glandes exocrines, son altération entraîne un dysfonctionnement au sein de tous les organes contenant du tissu épithélial (Encadré 1, p31). L'atteinte des voies respiratoires est la première cause de morbidité et de mortalité. Elle résulte d'une obstruction des voies respiratoires suite aux sécrétions anormales de mucus visqueux,⁵⁷ d'une succession d'épisodes infectieux et d'inflammation conduisant à la destruction du parenchyme pulmonaire, à la fibrose puis à la détresse respiratoire :⁵⁸

- Dès la vie intrautérine : altération des mouvements ioniques et hydriques au niveau des cellules épithéliales jouant un rôle important dans la composition des sécrétions conduisant à un mucus déshydraté et épais.
- Peu après la naissance : début des infections bactériennes associées à une réponse neutrophile localisée aux espaces endo- et péribronchiaux.
- Pendant l'enfance : réponse inflammatoire intense que la culture bactérienne soit positive ou négative.
- Chez les individus plus âgés : persistance de l'inflammation à prédominance neutrophile associée à des taux élevés d'IL-8 et d'élastase neutrophile.

4. Impact de la maladie sur les mécanismes de défense pulmonaire

Le système respiratoire sain est maintenu stérile à partir de la première division bronchique. Malgré les contacts permanents avec les pathogènes contenus dans l'environnement, cette stérilité est maintenue grâce au système mucociliaire qui permet un nettoyage mécanique de l'arbre respiratoire et au mucus qui contient de nombreux composants impliqués, à la fois, dans la lutte contre les pathogènes et la protection du parenchyme pulmonaire. Ce dernier mécanisme est renforcé par l'action des cellules immunitaires, macrophages, polynucléaires neutrophiles et cellules dendritiques, recrutées par les molécules de signalisation présentes dans le mucus.⁵⁹

Les fonctions immunitaires innées des cellules épithéliales des voies aériennes sont cruciales dans la pathogénèse d'un certain nombre de maladies chez l'homme. La défaillance de l'appareil local de défense de l'hôte peut entraîner une colonisation microbienne voire une infection des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire. L'activité du système immunitaire inné est étroitement liée au processus inflammatoire. Toutes les maladies majeures du poumon impliquent le système d'immunité innée et adaptative. Asthme et broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) sont des maladies inflammatoires chroniques au cours desquelles les cytokines et autres médiateurs sécrétés par l'épithélium respiratoire jouent un rôle critique.³⁷

Chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections des voies aériennes basses sont très fréquentes et très difficiles à éradiquer. Différentes études ont montré que la colonisation, par des pathogènes spécifiques, du poumon des patients atteints de mucoviscidose évoluait de façon séquentielle.^{58,60} On observe ainsi la colonisation par *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* durant la première année de vie, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* ne fait son apparition qu'au cours de la deuxième année de vie. Le fait que l'inflammation soit

simplement la conséquence de l'infection ou, plus directement, liée au déficit en CFTR n'est pas élucidé. Un certain nombre de données relie le fait d'avoir un CFTR mutant à une susceptibilité accrue à l'infection. De nombreuses études avancent que les sujets malades ont une moindre capacité d'élimination mucociliaire dû à la mutation primaire, ce qui les exposerait aux infections par des organismes divers et variés.⁴⁸ Une hypothèse controversée suggère qu'il existe un défaut de phagocytose de *P. aeruginosa* par les cellules épithéliales respiratoires, tendant à faciliter l'infection.⁶¹ Le récepteur pour *P. aeruginosa*, asialo-GM1, est significativement augmenté au sommet des cellules de l'épithélium respiratoire des patients atteints de mucoviscidose et pourrait favoriser l'infection en augmentant l'adhérence du germe sur les cellules.⁶²

4.1 Anomalie du surfactant

- Concentration élevée en sel

Une équipe de recherche a démontré que la concentration élevée en sel, due à la déficience du canal CFTR, dans le fluide présent à la surface de l'épithélium respiratoire interférerait avec les agents antibiotiques naturels contenus dans ce fluide, tels que les défensines et le lysozyme.^{40,63} Lorsque les bactéries se trouvent à la surface apicale de cellules épithéliales, les cellules mucoviscidosiques sont incapables de les éliminer, contrairement aux cellules épithéliales saines. Si ces mêmes bactéries étaient placées au niveau de la surface basale de ces cellules, aucune des deux lignées n'étaient capable de les éliminer. Par ailleurs si la concentration en sel était artificiellement augmentée à la surface apicale des cellules saines ou diminuée à la surface apicale des cellules mucoviscidosiques, le phénomène s'inversait. La mesure de la concentration en sel aux deux pôles des cellules saines a montré que la concentration en sel au niveau de la surface apicale était deux fois moins élevée qu'au niveau de la surface basale. La concentration en sel au niveau de la surface apicale des cellules mucoviscidosiques était deux

fois plus élevée que celle retrouvée au niveau de la surface apicale des cellules saines. Les deux lignées produisaient le même volume de fluide à leur surface apicale.

- Déshydratation de la surface pulmonaire

En se basant sur des expériences similaires à celles décrites ci-dessus, l'équipe de Boucher arrive à une autre conclusion^{64,65} qui est celle retenue de nos jours et fait l'objet de recherche à visée thérapeutique.⁶⁶ Les voies respiratoires mucoviscidosiques favoriseraient l'installation des pathogènes suite à une défaillance de l'appareil mucociliaire. Lors de leurs études, aucune différence de contenu de sel ni d'osmolarité n'a été retrouvée entre les cellules saines et les cellules mucoviscidosiques. En revanche, l'épaisseur de fluide à la surface des cellules mucoviscidosiques était réduite de moitié par rapport aux cellules saines. Du fait de la moindre épaisseur du fluide de surface, les mouvements ciliaires se trouvaient entravés.

- Déficit de la défense oxydative

Les bactéries inhalées sont emprisonnées dans le fluide recouvrant l'épithélium respiratoire puis propulsées vers le pharynx par les mouvements ciliaires. L'efficacité de cette élimination physique est incomplète. Elle ne suffit pas à éviter l'adhérence des bactéries à l'épithélium. Des peptides antimicrobiens sont sécrétés par les cellules de la sous-muqueuse. Certains pathogènes sont résistants à ces peptides mais ne provoquent pas de réaction inflammatoire ni de colonisation de l'arbre respiratoire chez les sujets sains. Duox2 appartient au groupe des enzymes dual oxydase qui ont la capacité de générer directement du H_2O_2 . Cette enzyme est exprimée au niveau de l'épithélium des voies aériennes mais participe aussi à la synthèse de la thyroxine dans la glande thyroïde et est présente dans le tube digestif où son rôle reste inconnu à ce jour. Dans l'épithélium respiratoire, cette enzyme génère suffisamment d' H_2O_2 pour produire de l'hypothiocyanate bactéricide ($OSCN^-$) en présence de lactoperoxydase et de thiocyanate. La formation d' $OSCN^-$ entraîne l'élimination de *S. aureus* et *P. aeruginosa* de la surface épithéliale sans endommager le parenchyme pulmonaire. Les cellules épithéliales des

patients atteints de mucoviscidose ne sécrète pas de thiocyanate rendant ce mécanisme de défense oxydative défectueux.⁶⁷

- Rôle des polynucléaires neutrophiles

Une étude⁶⁸ a cherché à déterminer si le fluide pulmonaire prélevé sur des épithéliums de patients atteints de mucoviscidose inhibait les fonctions antimicrobiennes des neutrophiles (*in vitro*). L'élimination des bactéries était défectueuse lorsque les neutrophiles étaient incubés dans du fluide issu de patients atteints de mucoviscidose par rapport à l'incubation dans le fluide issu de patients sains. En revanche la mobilité des neutrophiles était équivalente dans les deux groupes. L'analyse des données montrait une tendance sans significativité à une moindre sécrétion enzymatique des neutrophiles incubés dans le fluide issu de patients atteints de mucoviscidose par rapport à l'incubation dans le fluide issu de patients sains. Il n'y avait pas de différence dans la phagocytose de *P. aeruginosa* entre les deux groupes. Les bactéries survivaient plus longtemps dans le fluide issu de patients atteints de mucoviscidose que dans le fluide issu de patients sains.

4.2 Inflammation primaire ou anomalie de la réponse immunitaire

Dans des conditions normales, les voies aériennes restent relativement stériles du fait de l'action efficace des cellules ciliées. L'absence de CFTR fonctionnel à l'apex des cellules de l'épithélium respiratoire des patients atteints de mucoviscidose entraîne l'arrêt du transport des anions cAMP stimulés et les bactéries dont *P. aeruginosa* s'accumulent dans le fluide de surface et sont la cible d'une réaction inflammatoire très importante. La réponse immunitaire innée des cellules de l'épithélium respiratoire vis-à-vis de ces bactéries implique l'activation de récepteurs et de voies de signalisation, la production et le relargage de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de macrophages et de polynucléaires neutrophiles vers la région infectée. L'une des cibles de cette réaction inflammatoire précoce est la flagelline, cons-

tituant du flagelle de *P. aeruginosa*. Bien que la réponse inflammatoire à la présence des bactéries soit réelle dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, il existe une incertitude sur le fait qu'il existe une telle réaction en raison de l'accumulation d'un très grand nombre de bactéries, ou parce que l'épithélium présente un défaut dû à la mucoviscidose qui entraîne un état hyperinflammatoire au cours duquel il existe une production et une sécrétion constitutive de cytokines proinflammatoires et une réponse exacerbée à la présence de bactéries.⁶⁹

- Inflammation primaire

L'hypothèse d'inflammation primaire, ou endogène, est basée, tout d'abord, sur des observations cliniques d'inflammation précédant la détection des infections chez des nouveau-nés et de jeunes enfants atteints de mucoviscidose. Les LBA réalisés montraient une infiltration des neutrophiles, une augmentation des niveaux d'IL-8⁷⁰⁻⁷² mais étaient stériles en ce qui concernait la culture bactérienne.⁷¹ Une autre étude défend ce concept.⁷³ L'inflammation précoce a été examinée sur des xénogreffes de voies aériennes humaine fœtale chez des souris SCID. Une augmentation significative de la sécrétion d'IL-8 a été observée dans la partie proximale des voies aériennes greffées de fœtus atteints de mucoviscidose par rapport aux voies aériennes de sujets sains. Le recrutement des neutrophiles vers la membrane basale et le mouvement vers la surface épithéliale était aussi plus important que chez les souris greffées avec des voies aériennes de sujets sains. Les observations étaient identiques dans la partie distale des voies aériennes. Une explication possible serait que le mutant CFTR augmente directement l'activation de la transcription de NF- κ B.⁷⁴ NF- κ B, en particulier l'hétérodimère p50/p65, est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de médiateurs pro inflammatoires.⁷⁵ De plus, des cytokines « protectrices », telle que IL-10, qui servent à faire disparaître l'inflammation et qui sont sous contrôle du NF- κ B, ont été trouvées significativement diminuées chez les patients atteints de mucoviscidose.⁷⁶ Des éléments techniques peuvent aussi

expliquer les différences observées entre les cellules mucoviscidosiques et les cellules saines. Quelques études revues par Machen⁶⁹ ont ainsi montré qu'en travaillant sur une seule lignée dont on corrigeait le déficit en CFTR pour obtenir les cellules saines, les différences observées entre les deux groupes disparaissaient.

- Anomalie de la réponse immunitaire

La protéine CFTR mutée contribue, non seulement, à la déshydratation du fluide à la surface de l'épithélium respiratoire et au risque d'infections pulmonaires mais également au dysfonctionnement de la réponse inflammatoire dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose.^{74,77,78} Malgré l'afflux de polynucléaires neutrophiles sur le site de l'infection, la colonisation précoce des voies aériennes des patients suggère une moindre efficacité des polynucléaires neutrophiles recrutés.

La réponse inflammatoire observée dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose s'apparente à celle observée lors d'infections aiguës. Cette réponse est incapable d'évoluer et de promouvoir la réponse médiée par les macrophages telle quelle est observée lors des infections chroniques du sujets indemne de mucoviscidose.⁵⁸ Les médiateurs majeurs de l'influx neutrophile dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose comprennent l'IL-8, le TNF α , l'IL-1 et leucotriène B₄. L'IL-8, produit par les cellules épithéliales stimulées, les macrophages et les neutrophiles, paraît être le facteur dominant.^{79,80} L'IL-1 β , le TNF α , l'élastase neutrophile, le LPS et les antigènes de *P. aeruginosa* peuvent stimuler la production d'IL-8 pour entretenir l'afflux de neutrophiles. De nombreuses études ont montré que les polynucléaires neutrophiles de patients mucoviscidosiques sécrèteraient une quantité plus importante d'IL-8 que les polynucléaires neutrophiles des sujets sains. Cependant le nombre de récepteur à l'IL-8 à la surface des polynucléaires neutrophiles d'un patient mucoviscidosique est significativement diminué par rapport à celui d'un sujet sain. Le chimiotactisme des polynucléaires par les métabolites bactériens est donc moins efficace et contribue à

la chronicisation des infections bactériennes.⁷⁹ Lors d'une étude sur la comparaison de la production d'IL-8 et du récepteur antagoniste à l'IL-1 (IL-1ra) par les polynucléaires neutrophiles issus des expectorations, d'une part, et du sang, d'autre part, d'enfants atteints de mucoviscidose, il a été montré que l'augmentation de la production d'IL-8 dans les voies aériennes par rapport à un sujet sain était encore plus importante que dans le sang. L'ajout de lipopolysaccharide (LPS) n'entraînait pas d'augmentation de la sécrétion d'IL-8. La dexaméthasone était incapable de réprimer la production d'IL-8 que ce soit en l'absence ou en présence de LPS. Les niveaux de production d'IL-8 étaient comparables chez les patients atteints de mucoviscidose, qu'ils soient ou non colonisés par *P. aeruginosa*.⁸¹ Par ailleurs, il existerait une diminution de la production de molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-1ra et l'IL-10.^{81,82} Ces polynucléaires mucoviscidosiques produisent plus d'élastase, d'espèces réactives de l'oxygène et ont une plus grande activité myéloperoxydase, autant d'éléments contribuant à la destruction du parenchyme pulmonaire.⁸³

5. Microbiologie du poumon dans la mucoviscidose

5.1 Aspects chronologiques des infections bactériennes

Lors de la mucoviscidose, il existe un panel unique de pathogènes bactériens qui sont le plus souvent acquis suivant une séquence dépendante de l'âge (Figure 10, p41).⁵⁸ Seul *S. aureus* est considéré comme étant potentiellement pathogène chez l'immunocompétent, tous les autres sont des pathogènes opportunistes. Les autres pathogènes habituellement rencontrés dans la mucoviscidose comme *Aspergillus sp.* et les mycobactéries non tuberculeuses sont aussi des germes opportunistes.

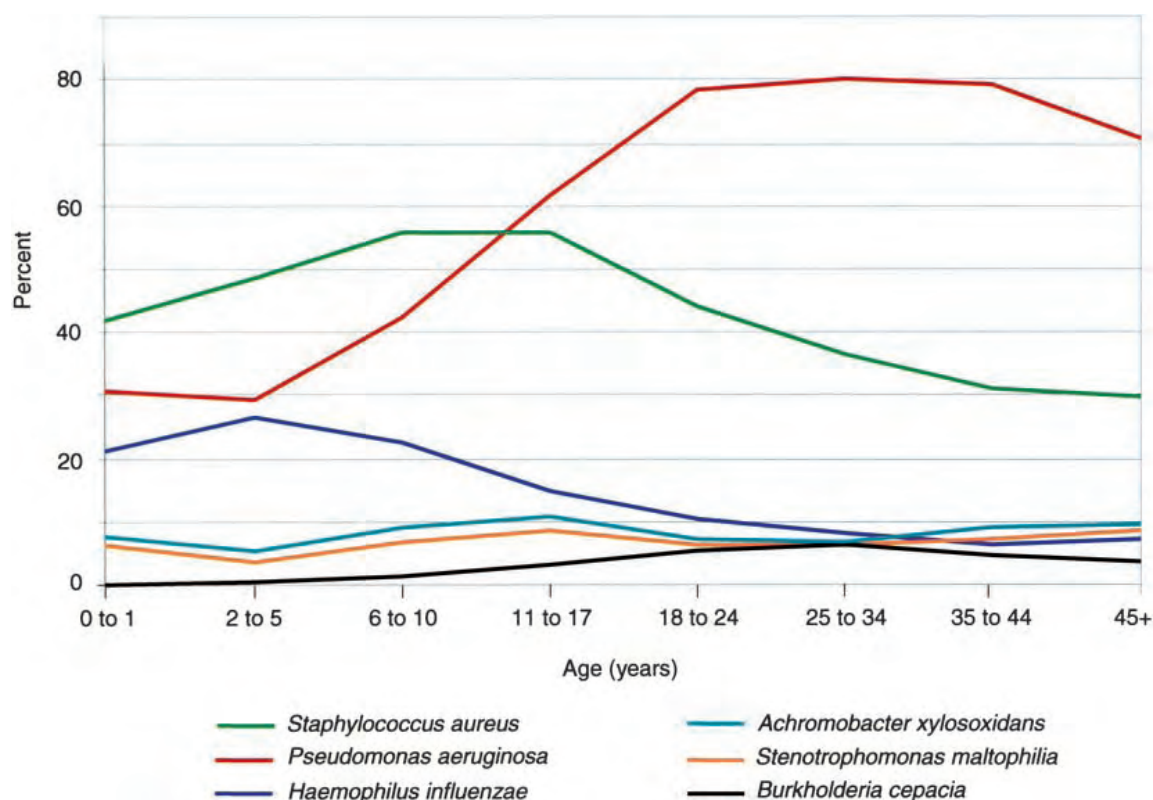


Figure 10 : Prévalence des infections des voies aériennes en fonction de l'âge⁵⁸

S. aureus est souvent la première bactérie isolée des voies respiratoires des jeunes enfants atteints de mucoviscidose, cependant son rôle dans le déclenchement de l'infection respiratoire chez ces patients est toujours controversé.^{60,84}

5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est, de loin, le germe le plus important tant en fréquence qu'en pathogénicité dans la mucoviscidose. En se basant sur les réponses immunitaires des jeunes enfants, l'infection semble survenir beaucoup plus tôt que ce qui avait été publié auparavant.⁸⁵⁻⁸⁷ La moyenne d'âge de détection des anticorps anti-*P. aeruginosa* est de 15 mois, alors que la moyenne d'âge de détection du germe dans les voies aériennes supérieures et inférieures est de 22 mois. Les facteurs de risques d'apparition du *P. aeruginosa* sont le sexe féminin, le génotype Phe508del homozygote et l'isolement du *S. aureus*. Presque 80% des patients atteints de mucoviscidose sont infectés par ce pathogène,⁵⁸ et l'acquisition de cette bactérie est asso-

ciée avec une détérioration clinique sur le plan respiratoire.⁸⁸⁻⁹² L'infection à *P. aeruginosa* survient souvent sous la forme mucoïde qui crée une barrière physique à l'élimination par les défenses de l'hôte.

P. aeruginosa se lie au récepteur asialo-GM1 via pili, induisant une production d'IL-8. Aucune up-régulation n'est observée lors de l'utilisation d'un *P. aeruginosa* sans pili. Les cellules épithéliales portant une protéine CFTR mutée ont montré une plus grande adhérence de *P. aeruginosa* en comparaison aux cellules témoins. De plus, l'expression d'une protéine CFTR sauvage au sein d'une cellule de lignée mucoviscidose a entraîné une diminution de l'adhésion de *P. aeruginosa*.^{62,74,93} L'augmentation de l'adhésion de *P. aeruginosa* à la surface des cellules mutées serait secondaire à l'augmentation du récepteur asialo-GM1.^{62,93,94} L'expression de ce récepteur est augmentée dans les cellules portant une protéine CFTR mutée mais aussi dans les cellules présentes dans les zones de régénération épithéliale au cours d'un processus inflammatoire ce qui est le cas des cellules des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose.^{93,94}

5.3 Données mycologiques

Les champignons sont des pathogènes réputés comme étant d'apparition tardive. La survenue de l'infection fongique a été reliée à la prise fréquente d'antibiotiques à larges spectres.⁹⁵ Alors que *Candida sp.* est le champignon le plus fréquemment isolé (50 à 75%) des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, il est considéré comme un germe commensal. *Aspergillus sp.*, et plus particulièrement *A. fumigatus*, est isolé chez plus de 25% des patients, qui présentent le plus souvent une aspergillose bronchopulmonaire allergique. Les milieux de culture spécifiques aux champignons filamenteux permettent d'isoler ceux-ci de façon significativement plus fréquente que les milieux de culture pour bactérie.^{96,97} Dans le cadre de la proposition d'un protocole hospitalier de recherche clinique (PHRC-1902 « Mucofong ») visant à évaluer le risque fongique dans la mucoviscidose, la prévalence des espèces, l'impact

sur l'évolution clinique et la prise en charge thérapeutique, une étude pilote a été menée, à Lille, sur 21 patients.⁹⁸ Parmi ces patients, 72% présentaient des levures dans les expectorations et 61% des espèces filamenteuses. Dans 44% des cas, les levures et les champignons filamenteux étaient associés. Sept espèces filamenteuses et trois espèces de levures ont été identifiées (Figure 11, p43). La majorité des patients vivaient dans un environnement immédiat déconseillé dans le cadre de la mucoviscidose (animaux domestiques, plantes en pots) mais aucune relation n'a pu être mise en évidence entre ces facteurs et la présence de micro-mycètes dans l'expectoration.

Espèces	Nombre de prélèvements positifs	Répartition des espèces (%)	Pourcentage global de présence / 18 patients ^a
A : Espèces filamenteuses			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	40 %	33,3 %
<i>Aspergillus terreus</i>	1	6,6 %	5,5 %
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	6,6 %	5,5 %
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	6,6 %	5,5 %
<i>Penicillium spp.</i>	4	26,6 %	22,2 %
<i>Scedosporium apiospermum</i>	1	6,6 %	5,5 %
<i>Exophiala dermatidis</i>	1	6,6 %	5,5 %
B : Espèces lévuriformes			
<i>Candida albicans</i>	11	78,6 %	61,1 %
<i>Candida glabrata</i>	2	14,3 %	11 %
<i>Candida dubliniensis</i>	1	7,1 %	5,5 %

^a 18 patients sur les 21 inclus étaient expectorants.

Figure 11 : Présence fongique et répartition des espèces dans la population étudiée⁹⁸

Une étude récente menée par Gangell⁹⁹ avait pour objectif de montrer que l'intensité de la réponse inflammatoire dans les poumons des enfants atteints de mucoviscidose dépendait du ou des pathogènes présents dans les voies aériennes. Pour leur démonstration, 653 liquides de lavages bronchoalvéolaires ont été prélevés chez 215 enfants et ont été examinés sur le plan microbiologique (mise en culture), cytologique (numération des éléments cellulaires) et immunologique (dosage de l'IL-8 dans le surnageant). Bien que le nombre d'enfants infectés par un pathogène isolé soit faible, ceux qui étaient infectés par *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *Aspergillus sp.* avaient des niveaux d'inflammation pulmonaire (nombre de polynucléaires et quantité

de cytokines proinflammatoires) plus élevés que les enfants non infectés. La coinfection ainsi qu'un inoculat plus élevé entraînait une réponse inflammatoire significativement plus intense, quel que soit le pathogène. La réponse inflammatoire n'était pas plus intense en présence de *Candida sp.* par rapport au groupe témoin. La très forte réponse inflammatoire en présence d'*Aspergillus sp.* était inattendue car les patients n'avaient pas de signes cliniques ou biologiques d'ABPA.

- *Aspergillus sp.*

A. fumigatus est de loin le plus fréquent avec une prévalence pouvant atteindre 57% des patients selon les études. Les autres espèces d'*Aspergillus* telles que *nidulans*, *niger* ou *flavus* sont régulièrement rencontrées mais le plus souvent de façon transitoire. *A. terreus*, bien que moins fréquemment isolé qu'*A. fumigatus*, pourrait être responsable d'ABPA. Une analyse moléculaire des souches d'*A. fumigatus* a montré que plusieurs génotypes pouvaient être présents dans les expectorations d'un même patient.¹⁰⁰ Les auteurs ont montré que chez les patients récemment colonisés, plusieurs génotypes pouvaient coexister mais qu'avec le temps l'un d'eux pouvaient devenir prédominant. Quatre profils de colonisations ont été décrits : (1) génotypes identiques ou proches isolés pendant toute la période de suivi montrant que le patient était incapable d'éliminer l'isolat, (2) un génotype prédominant présent pendant toute la durée du suivi, (3) une succession de génotypes avec élimination puis recolonisation, et (4) un génotype unique isolé une seule fois suggérant que le patient a été capable de l'éliminer. Dans le cas des deux premiers profils, une incapacité à éliminer le pathogène pourrait être un élément significatif dans la pathogénèse de la maladie. En 2008, une étude de plus grande envergure, incluant les souches étudiées par Cimon¹⁰⁰ et utilisant une technique de typage moléculaire par microsatellite, plus discriminante, a abouti à des conclusions contradictoires. En effet, tous les patients, sauf un, étaient colonisés avec une souche persistante d'*A. fumigatus* et 80% d'entre eux étaient co-colonisés avec d'autres souches isolées de façon transitoire suggé-

rant que certaines souches seraient capables de colonisation persistante alors que d'autres ne le seraient pas.¹⁰¹ Une étude plus récente menée par Rougeron a mis en évidence trois profils différents de colonisation à *A. terreus*: (1) une colonisation chronique par un génotype dominant, (2) une colonisation persistante par deux génotypes distants ou proches, (3) des colonisations transitoires par des génotypes différents.¹⁰² Ces différences peuvent s'expliquer par le nombre d'isolats étudiés et la méthode de génotypage choisie. Malgré ces discordances, il existe une grande diversité de génotypes impliqués dans la colonisation de l'arbre respiratoire du patient atteint de mucoviscidose que ce soit pour *A. fumigatus* ou pour *A. terreus*. D'autres espèces, plus rares, ont pu être mis en évidence après séquençage de souche d'*Aspergillus* sp.¹⁰³

- *Scedosporium apiospermum*

D'autres champignons tels que *S. apiospermum* sont isolés des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose.¹⁰⁴ Dans une revue de la littérature, Pihet rapporte que les trois champignons filamenteux les plus fréquemment isolés dans les prélèvements des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose sont *A. fumigatus*, *S. apiospermum* et *Exophiala dermatitidis*.¹⁰⁵ Une étude longitudinale¹⁰⁴ menée entre Giens et Angers (France) a montré que *S. apiospermum* était au second rang des champignons filamenteux les plus fréquemment associés à la mucoviscidose avec une prévalence de 8,6%. Ces données ont été confirmées ultérieurement par deux études réalisées en Australie et en Autriche.¹⁰⁵ L'isolement de *S. apiospermum* était, en général, consécutif à une colonisation par *A. fumigatus*. Sur dix des onze patients porteurs de *S. apiospermum*, *A. fumigatus* était aussi isolé dans le même prélèvement respiratoire. En 2010,¹⁰⁶ Paugam montrait sur une population de 201 patients adultes, chez qui 657 prélèvements respiratoires avaient été réalisés, que 65,6% des patients avaient eu, sur au moins un prélèvement, une culture positive pour un champignon filamenteux au cours de la période de suivi. Les champignons les plus fréquemment isolés étaient les *Asper-*

gillus sp. (*A. fumigatus* 56,7%, *Aspergillus* autres 10,4%) et *S. apiospermum* (3,4%). Dans une autre étude, l'identification par génotypage des différentes espèces du complexe *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* a suggéré une répartition géographique en fonction des espèces retrouvées chez des patients français atteints de mucoviscidose. Par ailleurs, toutes les espèces retrouvées étaient capables de colonisation.¹⁰⁷

- Autres champignons

Exophiala dermatitidis

E. dermatitidis a aussi été rapporté avec parfois une prévalence élevée mais dans une zone géographique très limitée.¹⁰⁵ Une étude belge publiée en 2010,¹⁰⁸ retrouvait une prévalence de 5,8% (9 patients) de colonisation par *E. dermatitidis* chez 154 patients atteints de mucoviscidose. Tous les patients étaient porteurs d'une insuffisance pancréatique et avaient plus de 12 ans. Huit patients étaient homozygotes pour la mutation Phe508del. Aucun cluster n'a pu être mis en évidence en fonction de l'origine géographique, la date de l'isolement ou la susceptibilité aux antifongiques.¹⁰⁹

Rasamsonia argillacea (anciennement *Geosmithia argillacea*)¹¹⁰

Rasamsonia est un champignon filamenteux dont le genre est proche de celui de *Penicillium* sp. pouvant conduire à des erreurs d'identification morphologique.¹¹¹ Ces erreurs peuvent être corrigées par le séquençage moléculaire de l'isolat. Les difficultés d'identification morphologique entraînent probablement une sous-estimation de sa prévalence dans la population des patients atteints de mucoviscidose. En 2010, une étude française rapportait 8 cas de colonisation chronique à *R. argillacea*.¹¹² Les patients colonisés présentaient tous la mutation Phe508del sur au moins un de leurs deux allèles. La colonisation survenait plus tôt chez les patients homozygotes pour cette mutation (10 ans) que chez les patients hétérozygotes (36 ans). La fréquence de l'homozygotie était plus élevée que dans la population des patients atteints de mucoviscidose en France. Tous les patients avaient reçu un traitement antifongique

par azolés (itraconazole ou voriconazole) en raison de la présence d'une espèce filamenteuse dans les sécrétions respiratoires avant la survenue de la colonisation. Au Royaume-Uni, Barton rapportait aussi huit cas de colonisation à *R. argillacea*.¹¹³ Comme précédemment, tous les patients étaient porteurs de la mutation Phe508del sur au moins un des deux allèles. Aucune association n'était retrouvée avec l'âge de survenue de la colonisation et la fonction respiratoire. *R. argillacea* est de plus en plus souvent mis en évidence dans les prélèvements respiratoires des patients, y compris ceux indemnes de mucoviscidose,¹¹³ cependant son rôle pathogène reste à déterminer.

Acrophialophora fusispora

Quelques cas de colonisation sporadique ou persistante par *A. fusispora* ont été décrits dans la littérature.¹¹⁴ Ce champignon présent dans le sol est rarement isolé de prélèvements humains, l'impact de sa présence dans les sécrétions bronchiques est inconnu. De plus comme pour *R. argillacea*, son diagnostic morphologique est difficile et entraîne peut-être une sous-estimation de sa prévalence.

Pneumocystis jirovecii

Une étude multicentrique française (Angers, Bordeaux, Dunkerque, Lille) réalisée sur une période de deux ans et demi (octobre 2006 – mars 2009) a permis de recueillir 146 expectorations de 104 patients atteints de mucoviscidose afin de rechercher la présence de *P. jirovecii*.¹¹⁵ L'ADN de *P. jirovecii* a été détecté chez 12,5% des patients, soit 17 échantillons positifs. Le taux de colonisation était significativement plus faible à Lille que dans les autres centres. Les patients colonisés n'avaient pas d'atteinte sévère de la fonction respiratoire. La présence de *P. jirovecii* était associée avec un meilleur VEMS que chez les patients non colonisés. La prévalence globale de la colonisation était comparable à celle retrouvée dans d'autres études européennes^{116,117} mais plus faible qu'au Brésil¹¹⁸ et que chez les sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive.¹¹⁹

D'autres champignons filamenteux (*Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* ou *Paecilomyces variotii*, *Schizophyllum commune*, *Rhizopus oryzae*, *Scedosporium prolificans*) ont été isolés de façon transitoire dans des prélèvements issus des voies aériennes de patients atteints de mucoviscidose.^{105,120}

Une grande variété des champignons filamenteux colonise l'arbre respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. L'estimation de la prévalence des champignons filamenteux dans le contexte de la mucoviscidose est très variable d'un centre à l'autre et largement tributaire du fait qu'il n'existe pas de méthode standardisée pour l'examen mycologique des crachats de ces patients.¹²¹ Pour certaines espèces, le potentiel pathogène du champignon est connu, pour d'autre, il reste à déterminer.¹¹³ C'est dans ce contexte que la constitution d'un groupe de travail sur les infections fongiques au cours de la mucoviscidose a été approuvée en 2006 par l'International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) afin d'en améliorer le diagnostic biologique, d'en évaluer l'impact clinique et d'identifier les sources potentielles de contamination.¹²²

***Aspergillus fumigatus* et mucoviscidose**

En comparaison de *P. aeruginosa*, l'impact d'*A. fumigatus* sur la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose est moins bien connu. *Aspergillus sp.*, le plus fréquemment *A. fumigatus*, est isolé chez plus de 25 % des patients.⁵⁸ Chez le patient atteint de mucoviscidose, la maladie aspergillaire la plus souvent décrite est l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA), encore appelée maladie de Hinson. Pendant longtemps, la majorité des travaux concernant *Aspergillus sp.* et mucoviscidose ont porté sur l'ABPA. La fréquence de l'isolement d'*Aspergillus sp.* dans un prélèvement respiratoire d'un patient atteint de mucoviscidose varierait entre 6 et 58% selon la littérature. Devant l'augmentation du nombre de prélèvement des voies aériennes retrouvant de l'*Aspergillus sp.* sans aucun autre élément pouvant expliquer des signes respiratoires, de plus en plus d'équipes travaillent sur l'impact que pourrait avoir *Aspergillus sp.* sur l'appareil respiratoire en dehors de la présence d'une ABPA.

1. Aspergillose bronchopulmonaire allergique

L'ABPA est la conséquence d'une réaction d'hypersensibilité vis-à-vis des antigènes d'*Aspergillus sp.* chez des patients souffrant d'asthme ou de mucoviscidose. Selon les données de la littérature, l'ABPA surviendrait chez 2 à 35% des patients atteints de mucoviscidose.¹²³⁻¹²⁷

C'est un syndrome difficile à diagnostiquer, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose car l'ABPA partage un certain nombre de critères diagnostiques (Tableau 2, p50) avec la mucoviscidose. Seule, l'ABPA fait actuellement l'objet de recommandations thérapeutiques officielles.¹²⁸

Critères pour le diagnostic d'ABPA chez les patients asthmatiques ⁹⁷	Critères pour le diagnostic d'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose ¹²⁹
(1) Asthme	(1) Détérioration respiratoire
(2) Bronchectasies proximales	(2) Modification de la radiographie thoracique
(3) Réactions cutanées immédiates à <i>Aspergillus sp.</i> ou <i>A. fumigatus</i>	(3) Réactions cutanées immédiates à <i>Aspergillus sp.</i> ou <i>A. fumigatus</i> ou IgE spécifiques anti- <i>A. fumigatus</i>
(4) IgE totales > 417 kU/L	(4) IgE totales > 1000 kU/L
(5) IgE ou IgG spécifiques anti- <i>A. fumigatus</i> élevées	(5) Anticorps précipitants ou IgG spécifiques anti- <i>A. fumigatus</i>

Tableau 2 : Critères pour le diagnostic de l'ABPA (asthme et mucoviscidose)

En l'absence d'ABPA, le rôle pathogène d'*Aspergillus sp.*¹³⁰⁻¹³² et le bénéfice du traitement par antifongiques d'une infection bronchique aspergillaire,^{133,134} diagnostiquée à partir de l'existence d'une culture positive sur une expectoration reste à déterminer.

2. Sensibilisation à *Aspergillus fumigatus*

Un certain nombre de patient atteints de mucoviscidose et qui sont exposés à *A. fumigatus*, va développer une sensibilisation à *A. fumigatus*. Parmi eux, certains développeront par la suite une ABPA. A ce jour, il n'a pas été identifié de critères prédictifs du développement d'une ABPA chez un patient sensibilisé.¹³⁵ La fréquence de la sensibilisation à *A. fumigatus*, associée ou non à la présence de signes cliniques, a été évaluée comme pouvant atteindre jusqu'à 59% des patients.^{126,132,136} Dans l'étude de Wojnarowski,¹³² en 1997, les auteurs concluaient que la sensibilisation à *A. fumigatus* chez les patients atteints de mucoviscidose était associée à une moins bonne fonction respiratoire. L'étude Kanthan en 2007¹³⁷ confirmait ces résultats alors que Maiz en 2002¹³⁸ avait pu mettre en évidence une tendance et non pas une association significative.

3. Colonisation à *Aspergillus fumigatus*

La prévalence de la colonisation à *Aspergillus sp.* varie entre 12 et 25% dans des populations de patients regroupant des enfants et des adultes.^{139,140} L'absence de consensus sur la définition de la colonisation à *Aspergillus sp.* comme elle peut exister pour *P. aeruginosa*^{86,141} ainsi

que l'absence de méthode standardisée pour l'examen mycologique des crachats de ces patients pourraient expliquer cette grande variabilité.¹²¹ Dans un article publié en 2006, Shoseyov¹³³ émet l'hypothèse de l'existence d'une maladie aspergillaire « non allergique » suite à l'amélioration clinique de six patients ayant été traités efficacement par itraconazole pour une détérioration de l'état respiratoire pour laquelle aucun autre pathogène qu'*Aspergillus sp.* n'avait pu être mis en cause. En 2010, Amin¹³⁰ démontrait lors d'une étude sur 230 patients que l'infection persistante à *A. fumigatus* était un facteur de risque d'admission à l'hôpital pour exacerbation de l'atteinte respiratoire des patients atteints de mucoviscidose.

Sensibilisation et colonisation par *Aspergillus fumigatus* au cours de la mucoviscidose, au CHU de Toulouse

Depuis quelques années, de plus en plus de patients atteints de mucoviscidose reçoivent des traitements antifongiques pour des exacerbations pulmonaires malgré l'absence de critères d'ABPA car la communauté des médecins impliqués dans le suivi de ces patients (pédiatres et pneumologues) est convaincue des conséquences délétères de la présence répétée des champignons filamenteux dans leur arbre respiratoire même en l'absence d'ABPA. Il paraît nécessaire de leur donner plus d'arguments scientifiques en évaluant, sur de plus larges cohortes, l'impact d'*A. fumigatus*, entre autre, sur la fonction respiratoire de ces patients.

1. Impact clinique des maladies aspergillaires

Bien que le diagnostic d'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose reste difficile, les recommandations sur la prise en charge de cette affection sont maintenant bien cadrées. En effet, il a été établi, à la fois au cours de la Conférence de Consensus de la Cystic Fibrosis Foundation¹²⁹ et par la Société Américaine des maladies infectieuses (IDSA),¹²⁸ qu'il était nécessaire d'introduire, en complément de la corticothérapie, un traitement antifongique chez les patients présentant un épisode d'ABPA.

Il a été constaté par les médecins prenant en charge les patients atteints de mucoviscidose, que certains étaient porteurs persistants d'*A. fumigatus* ou sensibilisés vis-à-vis d'*A. fumigatus*, mais ne présentaient pas les critères de diagnostic de l'ABPA. Cependant la fonction respiratoire de ces patients paraissait être altérée de façon concomitante à la découverte d'*A. fumigatus* dans les sécrétions bronchiques. Il nous a donc paru important d'identifier les différentes maladies causées par *A. fumigatus* chez le patient atteint de mucoviscidose et leurs ré-

percussions sur la fonction respiratoire afin de pouvoir envisager une prise en charge adéquate.

Les données enregistrées dans le dossier informatisé dédié au suivi des patients atteints de mucoviscidose ont été exploitées sur une période allant de janvier 1995 à juillet 2007. La base de données contenait toutes les données enregistrées par le médecin à chaque visite du patient dans un des deux Centre de Référence et de Compétence pour la Mucoviscidose de Toulouse (CRCM enfant et adulte). Des données démographiques (date de naissance, sexe), médicales (date du diagnostic, mutation génétique,^{51,142-144} indice de masse corporelle,¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ volume expiratoire maximal par seconde ou VEMS¹⁴⁸) et biologiques (dosage des IgE totales, dosage des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*, présence d'anticorps précipitants anti-*A. fumigatus*, présence de *P. aeruginosa*,¹⁴⁹ colonisation par *P. aeruginosa*,^{86,150} détection transitoire de *A. fumigatus*, culture positive persistante d'*A. fumigatus*¹⁵¹) ont été recueillies. Des groupes, qui paraissaient représentatifs des maladies aspergillaires rencontrées dans la pratique clinique, ont été constitués à partir des résultats des examens mycologiques et immunologiques :

- ABPA : IER ≥ 3 arcs,^{14,15} IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* $> 0,35$ UI/mL et IgE totales ≥ 500 UI/mL
- Sensibilisés : IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* $> 0,35$ UI/mL et IgE totales < 500 UI/mL
- Porteurs persistants : IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* $\leq 0,35$ UI/mL, avec soit une culture positive à *A. fumigatus* persistante soit une IER ≥ 3 arcs^{14,15} avec au moins une culture positive pour *A. fumigatus*

Deux cent cinquante et un patients ont été vus au cours de 6242 consultations entre le 1^{er} janvier 1995 et le 3 juillet 2007. Les données étaient exhaustives pour 206 de ces patients. Parmi ces patients, 34 (16%) présentaient une ABPA, 63 (31%) étaient sensibilisés vis-à-vis d'*A. fumigatus* et 37 (18%) étaient porteurs persistants d'*A. fumigatus* sans sensibilisation. Les 72

(35%) patients restant étaient exempts de toute maladie aspergillaire et constituaient le groupe témoin. L'analyse statistique¹⁵² des données de ces 206 patients a montré que :

- l'existence d'une ABPA, d'une sensibilisation vis-à-vis d'*A. fumigatus* ou d'un portage persistant d'*A. fumigatus* étaient indépendamment associés à un déclin de la fonction respiratoire (VEMS) plus important que chez les patients indemnes de maladies aspergillaires,
- la présence de *P. aeruginosa*, l'augmentation de l'âge, le sous-poids et un VEMS initial bas était aussi indépendamment associés à un déclin de la fonction respiratoire (VEMS),
- la survenue d'une sensibilisation vis-à-vis d'*A. fumigatus* chez un patient était définitive.

ORIGINAL ARTICLE

Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients

JUDITH FILLAUX^{1,2}, FRANÇOIS BRÉMONT^{3,4}, MARLÈNE MURRIS^{4,5},
SOPHIE CASSAING^{1,2}, JEAN-LUC RITTIE^{3,4}, LAURENT TÊTU^{4,5}, CHRISTINE
SEGONDS⁶, MICHEL ABBAL⁷, ERIC BIETH⁸, ANTOINE BERRY^{1,2},
BERNARD PIPY² & JEAN-FRANÇOIS MAGNAVAL¹

From the ¹Service de Parasitologie – Mycologie, CHU Rangueil, ²UMR152, Université Toulouse III, ³Service de Pneumologie Allergologie, Hôpital des Enfants, ⁴Centre de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose (CRCM) Enfant et Adulte, ⁵Service de Pneumologie Allergologie, Hôpital Larrey, ⁶Laboratoire de Bactériologie – Hygiène, Hôpital Purpan, ⁷Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Rangueil, and ⁸Service de Génétique Médicale, Hôpital Purpan, Toulouse, France

Abstract

Background: Cystic fibrosis (CF) patients presenting with persistent carriage of, or sensitization to, *Aspergillus fumigatus* are often treated with antifungal therapies because the presence of the fungus is commonly thought to impede lung function, even in the absence of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). The aim of this study was to assess *Aspergillus*-related status modulating the forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) of CF patients. **Methods:** From 1995 to 2007, 251 patients were evaluated. Demographic data, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR) mutations, body mass index, and FEV₁ were recorded. The presence of *A. fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* in sputum and the levels of *A. fumigatus* precipitin, total IgE (t-IgE), and specific anti-*A. fumigatus* IgE (Af-IgE) were determined. Patients were divided into 3 groups: (1) ABPA: *A. fumigatus* precipitin ≥ 3 lines, Af-IgE > 0.35 IU/ml, and t-IgE ≥ 500 IU/ml; (2) sensitization: Af-IgE > 0.35 IU/ml but t-IgE < 500 IU/ml; and (3) persistent carriage: Af-IgE ≤ 0.35 IU/ml with either an *A. fumigatus* persistent positive culture or an *A. fumigatus* precipitin ≥ 3 lines, provided this serological finding had been found associated with at least 1 *A. fumigatus*-positive culture. The remaining patients represented the control group. A multivariate analysis was carried out with FEV₁ as the outcome variable. **Results:** ABPA, sensitization, and persistent carriage were significantly associated with a larger decline in FEV₁ compared with the control group, with odds ratios of 15.9, 14.9, and 10.7, respectively. This association was independent of other associated factors (*P. aeruginosa* transient detection, age, being underweight, and low FEV₁ at baseline). **Conclusions:** In addition to ABPA, sensitization and persistent carriage appear to have an impact on pulmonary function in CF patients.

Keywords: Cystic fibrosis, fungal infection, pulmonary function, epidemiology

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common life-shortening autosomal-recessive diseases in Caucasians, affecting 1 in 2500 individuals [1]. Chronic endobronchial infection with CF-related pathogens and the associated neutrophil-dominated airway inflammation contribute to progressive obstructive pulmonary disease. *Pseudomonas aeruginosa* is the most significant bacterial pathogen associated with CF, and based on immune responses in young children, infection appears to occur much earlier than

previously thought [2]. The presence of *P. aeruginosa* and other pathogens in the lower airway is hypothesized to increase the host inflammatory response and thereby accelerate the process of airway damage [3]. Infection has been identified as an independent risk factor for the rate of decline in the forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) in children and adolescents presenting with CF [4,5].

In contrast to *P. aeruginosa*, the impact of *Aspergillus fumigatus* on pulmonary function is less well known. *Aspergillus* spp., most frequently *A. fumigatus*,

Correspondence: J. Fillaux, Service de Parasitologie – Mycologie, CHU Rangueil, 31059 Toulouse, France. Tel: +33 (0)5 61 32 32 05. Fax: +33 (0)5 61 32 28 96. E-mail: fillaux.j@chu-toulouse.fr

(Received 1 August 2011; accepted 15 May 2012)

ISSN 0036-5548 print/ISSN 1651-1980 online © 2012 Informa Healthcare
DOI: 10.3109/00365548.2012.695454

are isolated from more than 25% of patients [2]. *A. fumigatus* is a fungal pathogen that causes a wide range of pulmonary diseases, which are not restricted to CF patients. One of these diseases, allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is particularly frequent in CF patients, with a prevalence ranging from 2% to 25% [6–9]. Recommendations for the treatment of ABPA in patients with CF are now clearly established [10,11]. However, in the absence of ABPA, the pathogenic role of *A. fumigatus* [12–14] and the benefit of treatment [15,16] of an *A. fumigatus* bronchial infection, as diagnosed from a positive sputum culture, remain to be clarified. Nevertheless, CF patients presenting with *A. fumigatus* persistent positive cultures or sensitization to *A. fumigatus* often receive antifungal therapies because, among lung specialists, the presence of the fungus is commonly thought to impede lung function, even in the absence of ABPA. The aim of this study was therefore to assess the impact of persistent *A. fumigatus* carriage and sensitization as independent risk factors of a decline in pulmonary function in CF patients.

Materials and methods

From January 1995 to July 2007, details of patients with CF at the Toulouse Cystic Fibrosis Resources and Competence Centre of the Toulouse University Hospitals were entered into a database. The diagnosis of CF relied upon the detection of an iontophoretic sweat chloride level of 60 mEq/l or greater [17,18]. The database contained all data collected by physicians during each patient's visit, which occurred twice per year or more frequently if necessary. After the patients had received detailed information about the purpose of establishing this database, all of them gave their written consent for any electronic medical use of their information. Management of the database was compliant with French regulations concerning the protection of privacy (Commission Nationale Informatique et Libertés, Data Protection Statement No. 1203335). Patients lost to follow-up, those who died, and those who were transferred to another medical centre were evaluated based on our most recent information.

Demographic and medical characteristics

Date of birth, gender, diagnosis date, and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR) mutations were entered into the database. As previously reported [19–22], the 'severe/mild mutation' classification system [23] was used, and CFTR gene mutations were classified as mild mutations (classes IV and V, associated with residual

Impact of *Aspergillus* in cystic fibrosis patients 843

CFTR function) or severe mutations (classes I to III, equivalent to the 'null' mutation consequence, including patients with pancreatic insufficiency).

Body mass index (BMI) values and FEV₁ were recorded at each visit. BMI classes (underweight/normal weight) were determined using French age- and sex-specific curves if the age was under 18 y [24–26] and using international cut-off points for adults if the age was over 18 y. FEV₁ results were expressed as predicted percentages based on the accepted reference standard [27]. The result of the first FEV₁ yielded the FEV₁ baseline.

Laboratory investigations

Expectorated or induced sputum was collected at each visit and tested for the presence of *A. fumigatus* and *P. aeruginosa*. *A. fumigatus* was identified on the basis of macroscopic and microscopic examination of the culture [28] after the inoculation of vials containing Sabouraud–chloramphenicol–gentamicin agar medium (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). *P. aeruginosa* was identified according to the national recommendations for CF specimens [29]. Colonization by *P. aeruginosa* was defined as the presence of the pathogen in the bronchial tree for at least 6 months, based on at least 3 positive cultures taken at intervals of at least 1 month [30,31]. For *A. fumigatus*, the same definition was used but the term 'persistent positive culture' was chosen because it is impossible clinically to distinguish between colonization and infection. Positive detection without *A. fumigatus* persistent positive culture or *P. aeruginosa* colonization was defined as transient detection for *A. fumigatus* and *P. aeruginosa*, respectively. The Leeds criteria [32] could not be applied because approximately 50% of the patients made fewer than 4 visits a year. As a consequence, these patients would have remained unclassifiable.

The presence of precipitating antibodies to *A. fumigatus* (*A. fumigatus* precipitin) was detected using immunoelectrophoresis (IEP) (Beckman Instruments, CA, USA) against *A. fumigatus* antigenic extracts and metabolites (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The levels of total IgE (t-IgE) and specific anti-*A. fumigatus* IgE (Af-IgE) were determined by fluoro-enzyme immunoassay using an ImmunoCap[®] automated system (Phadia, Montigny-le-Bretonneux, France). All laboratory data were verified from the database handled by the management software in use in the laboratories of bacteriology, mycology, or immunology.

Patients were divided into groups according to the results of the laboratory investigations. The ABPA group included patients who displayed ≥ 3 precipitin lines found by IEP [33,34], a level of Af-IgE > 0.35

IU/ml, and a t-IgE dosage ≥ 500 IU/ml. The sensitization group displayed a level of Af-IgE > 0.35 IU/ml with a t-IgE dosage < 500 IU/ml. The characteristics of the persistent carriage group were the combination of an Af-IgE level ≤ 0.35 IU/ml with either an *A. fumigatus* persistent positive culture or the detection of *A. fumigatus*-precipitin ≥ 3 lines, provided this serological finding had been found associated with an *A. fumigatus* transient detection. The remaining patients represented the control group. At the end of the study, patients were ranked among the 3 groups. The 3 groups of patients were graded according to the patient's status from the worst to the best. This classification was based upon the following assumption: ABPA $>$ sensitization $>$ persistent carrier. Since the patient's status could worsen during the study period, some of them were finally allotted to a lower group, according to the definition of the groups.

Statistical analysis

The characteristics of the studied population were described using percentages and medians along with interquartile ranges (IQR) instead of means and standard deviations when the distributions were found to be non-Gaussian. A bivariate analysis was performed using the Kruskal-Wallis test (for non-normally distributed continuous variables), analysis of variance (ANOVA; for normally distributed continuous variables), or the Chi-square test (for dichotomous variables). Then, a multivariate analysis (linear mixed-effect model analysis [35]) was carried out with FEV₁ as the outcome variable, using a step-by-step descending method. The heterogeneity in the number of sputa and their spacing was managed by choosing the linear mixed-effect model analysis. This technique is convenient for the analysis of association between time and covariates from irregularly spaced serial data from individuals (i.e., repeated measurements), without being affected by missing data. Only variables found to be significant by bivariate analysis, with $p < 0.2$, were tested. The odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were used to describe associated factors (p -value of less than 0.05). All statistical tests and procedures were performed using the Intercooled Stata 9.2® statistical package (StataCorp, College Station, TX, USA).

Results

Two hundred and fifty-one patients were cumulatively evaluated 6242 times from 1 January 1995 to 3 July 2007. Among these patients, a complete set of data was available for 206 patients. The 45 patients for whom several parameters were missing were not

significantly different from the included patients (data not shown). Seventeen patients died during the study period, 16 were transferred to another medical centre, and 8 were lost to follow-up. The demographic and medical characteristics along with the results of the laboratory investigations are displayed in Table I.

One hundred and thirty-four patients exhibited CF associated with the characteristics of 1 of the 3 groups, namely ABPA ($n = 34$, 16%), sensitization to *A. fumigatus* ($n = 63$, 31%), or persistent carriage ($n = 37$, 18%); 72 (35%) represented the control group. Furthermore, when patients became sensitized, their Af-IgE levels remained positive until the end of the study.

Table II presents the results of the statistical analysis. The presence of ABPA, sensitization, or persistent carriage, being underweight, transient detection of *P. aeruginosa*, age, and a lower FEV₁ at baseline were significantly associated with an increased risk of having a change in the FEV₁. Colonization by *P. aeruginosa*, a high level of t-IgE, the severity of the mutation, and *A. fumigatus*-related abnormalities analyzed separately (transient detection of *A. fumigatus*, *A. fumigatus* persistent positive culture, or

Table I. Characteristics of the study population (number of patients = 251; number of visits = 6242); results are median (IQR), or n (%).

Age at the date of the CF diagnosis (months)	8.2 (1.6–38.4)
Age at the end of the study (y)	16.3 (9.8–23.6)
Follow-up duration (y)	3.6 (2.1–8.7)
Number of visits per patient per y	4.7 (3.4–6.7)
Number of FEV ₁ tests per patient	10 (2–23)
Baseline FEV ₁ (%)	83 (63–102)
Sex (male)	138 (55)
Severe mutation	175 (69.7)
CFTR mutation	
ΔF508/ΔF508	95 (37.8)
ΔF508/other	106 (42.2)
Other/other	29 (11.6)
Incomplete or unknown genotype	21 (8.4)
Known diagnosis at birth	18 (7.2)
At least 1 sputum examination positive for Pa	171 (68.1)
At least 1 sputum examination positive for Af	156 (62.1)
At least 1 episode of Pa colonization	54 (21.5)
At least 1 episode of Af persistent positive culture	68 (27.1)
At least 1 result showing Af IgE > 0.35 IU/ml	102 (39.5)
At least 1 result showing ≥ 3 precipitin lines with Af extracts	100 (39.8)
At least 1 result showing total IgE ≥ 500 IU/ml	36 (14.5)

IQR, interquartile range; CF, cystic fibrosis; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Af, *Aspergillus fumigatus*; IgE, immunoglobulin E.

Table II. Risk of a change in lung function (number of patients = 206; number of visits = 3249).

Variables	Bivariate analysis		Multivariate analysis Adjusted OR (95% CI)
	FEV ₁ (%), median (IQR)	p-Value	
Female		0.91	-
Male			-
Non-severe mutation		0.4	-
Severe mutation			-
Control group	92.5 (66–109)	< 0.01	1
Persistent carriage group	76 (60–98)		10.7 (3.0–18.3)
Sensitization group	76 (52–99)		14.9 (8.4–21.4)
ABPA group	81 (57–102)		15.9 (8.3–23.5)
Age at the visit (y)		< 0.01	1.9 (1.8–2.1)
Baseline FEV ₁ (%)		< 0.01	0.4 (0.3–0.5)
Normal weight	92 (70–108)	< 0.01	1
Underweight	56 (39–78)		7.7 (6.2–9.3)
No Pa detection	95 (71–111)	< 0.01	1
Transient Pa detection	68 (44–92)		8.0 (3.9–12.1)

FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; IQR, interquartile range; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval; ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*.

presence of *A. fumigatus* precipitin) were not significantly associated with a worse FEV₁. So the model that included the variable 'group' was preferred to a model that considered each *A. fumigatus*-related parameter separately. As shown in Table II, according to the multivariate analysis, ABPA, sensitization, and persistent carriage were significantly associated with a larger FEV₁ decline compared with the control group, with ORs of 15.9, 14.9, and 10.7, respectively. Furthermore, this association was independent of other associated factors such as transient detection of *P. aeruginosa*, increasing age, being underweight, and low FEV₁ at baseline. Figure 1 presents the slopes of the change in FEV₁ according to the significant variables.

Discussion

As far as we know, this study presents the first evaluation of the impact of both the sensitization and the persistent carriage of *A. fumigatus* on the FEV₁ in paediatric and adult CF patients examined as part of a 12-y observational cohort maintained at the Toulouse University Hospital, France. Unlike the assessment of each *A. fumigatus*-related parameter independently, the 3 groups together, i.e., ABPA, sensitization, and persistent carriage, were significantly and independently associated with a larger FEV₁ decline compared with the control group. Furthermore, this relationship was independent of transient *P. aeruginosa* detection. These results strengthen our hypothesis that the presence of *A. fumigatus*-positive sputum must not be considered separately

but rather must be regarded as part of a clinical condition to assess its harmful influence.

Our cohort was similar to those found in the literature with respect to the sex ratio [5,6,36], age [4,6,36], $\Delta F508$ mutation ratio [6,36], frequency of ABPA [6–9], frequency of *A. fumigatus* persistent positive culture [37], frequency of *P. aeruginosa* colonization [12], and *P. aeruginosa* transient detection [5]. As shown in other studies, transient *P. aeruginosa* detection [4,5,36], low weight-for-age [5], and greater age [4] were also independently associated with a worse respiratory status. Regarding the effect of genetic mutations on FEV₁, in our study, unlike others [4,36], the severity of the CFTR genotype was not independently associated with changes in FEV₁. At the present time, the literature on the effect of genetic CF mutations remains conflicting [19,21,22]. The effect on the decline in lung function of *P. aeruginosa* transient detection – but not of *P. aeruginosa* colonization – was demonstrated in our study. The explanation for this finding could be that antibiotic prophylaxis of *P. aeruginosa* colonization was increasingly employed through the period of the study. Unfortunately, the data concerning treatment were not sufficiently reliable to be used in the statistical analysis. Because it was an observational cohort, the number of visits per patient was heterogeneous, depending on the severity of the pulmonary disease. When patients were clinically lightly affected, they attended consultations only twice a year. This aspect has been managed by the statistical methods used.

First, in concordance with Kraemer et al. [36], we found that a sensitized profile with or without ABPA

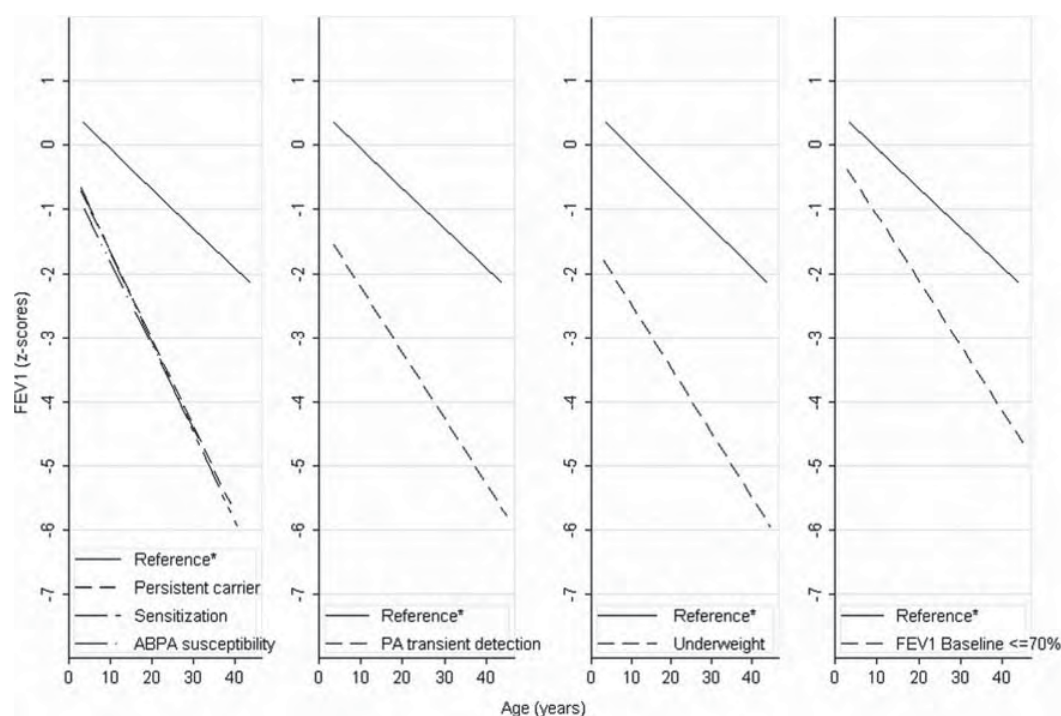


Figure 1. Progression of FEV₁ with age, according to the significant variables. Values are given as the mean changes in lung function computed from the fixed predicted values obtained by the linear mixed-effect model analysis, with the slope indicating the degree of progression.*The reference group represents a control group with 'no *Pseudomonas aeruginosa* transient detection', 'normal BMI', and 'FEV₁ baseline >70%'. (FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; BMI, body mass index; ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; PA, *P. aeruginosa*.)

was associated with a larger FEV₁ decline in CF patients compared to the FEV₁ decline of the non sensitized CF patients. Unlike Wojnarowski et al. [14], we observed this association even when the t-IgE level was <500 IU/ml (sensitization group). Among the sensitized patients, some but not all experienced an ABPA event. These results are consistent with the results of Hutcheson et al. Some patients developed up to 5 parameters of sensitization to *A. fumigatus* without developing ABPA [38]. Moreover, our study clearly demonstrates that when sensitization to *A. fumigatus* occurred, it became permanent.

Second, we showed that persistent carriage of *A. fumigatus* led to a significant change in lung function. This result supports those of Amin et al., who showed that persistent *A. fumigatus* infection was an independent risk factor for hospital admission [12]. In contrast, de Vrankrijker [39] found no significant difference in the lung function decline. This result could be explained by the constitution of the group, which was not based on the presence or the absence of colonization but rather on the duration of colonization. The pathogenic role of *A. fumigatus* in the absence of ABPA was previously underlined by the study of Shoseyov et al. [15], in which lung function improved in patients after antifungal treatment. The authors presented 6 CF

patients with respiratory deterioration and *A. fumigatus*-positive sputum cultures who did not meet the ABPA criteria and did not respond to appropriate antibiotic therapy, at which point treatment with antifungal agents was followed by an improvement in the clinical condition.

In conclusion, in addition to ABPA, persistent *A. fumigatus* carriage and *A. fumigatus* sensitization appear to have an impact on pulmonary function. Therefore, in agreement with others [12,13,16], we suggest that in patients with CF, *A. fumigatus* should be considered a pathogen that may directly impair respiratory function. Despite the existence of some limitations, this study is relevant to the community of lung specialists in their practice and could form the basis of prospective clinical research on this topic, because the correct course of treatment for these *A. fumigatus*-induced diseases remains to be determined. Although the most recent clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America recommend itraconazole and corticosteroids for the treatment of ABPA [11], further studies are necessary to evaluate the efficacy of antifungal therapies in persistent carriers and in sensitized CF patients.

Declaration of interest: No financial support or conflict of interest.

References

- [1] Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest* 2004;125(1 Suppl):1–39.
- [2] Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:918–51.
- [3] Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Wagener JS, et al. Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2009;154:183–8.
- [4] Burggraeve N, Branger B, Dabadie A, Deneuville E, Rault G, Roussey M. Longitudinal evaluation of pulmonary function tests in children with newborn screening for cystic fibrosis. Relationships with pulmonary infection. Study of 40 children undergoing 744 pulmonary function tests. *Arch Pediatr* 2007;14:864–9.
- [5] Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, Pasta DJ, Craib ML, Silva SJ, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2007;151:134–9.
- [6] Bellis G, Cazès MH, Fuhrman C, Lemonnier L, Moreau T, Rault G, et al. Cystic Fibrosis French Registry—report 2006. Paris: Vaincre la Mucoviscidose & Ined; 2009.
- [7] Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:685–92.
- [8] Mastella G, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Navarro J, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001;17:1052–3.
- [9] Thia LP, Balfour Lynn IM. Diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2009;10:37–42.
- [10] Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis—state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* 2003;37(Suppl 3):S225–64.
- [11] Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46:327–60.
- [12] Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* 2010;137:171–6.
- [13] Kraemer R, Delosea N, Ballinari P, Gallati S, Cramer R. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1211–20.
- [14] Wojnarowski C, Eichler I, Gartner C, Gotz M, Renner S, Koller DY, et al. Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1902–7.
- [15] Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, Kerem E. Aspergillus bronchitis in cystic fibrosis. *Chest* 2006;130:222–6.
- [16] Skov M, Hoiby N, Koch C. Itraconazole treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Allergy* 2002;57:723–8.
- [17] Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 2008;153:S4–14.
- [18] Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:545–9.
- [19] de Gracia J, Mata F, Alvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M, et al. Genotype–phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax* 2005;60:558–63.
- [20] McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 2003;361:1671–6.
- [21] Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 2003;67(Pt 5):471–85.
- [22] Zielinski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117–33.
- [23] Castellani C, Cuppens H, Macek MJ, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7:179–96.
- [24] Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000;320:1240–3.
- [25] Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé. Courbes enfants. INPES; 2006. Available at: http://www.inpes.sante.fr/50000/pdf/courbes_enfants.pdf (accessed 27 May 2009).
- [26] Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempe M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A. Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 1991;45:13–21.
- [27] Wang X, Dockery DW, Wypij D, Fay ME, Ferris BG Jr. Pulmonary function between 6 and 18 years of age. *Pediatr Pulmonol* 1993;15:75–88.
- [28] Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: CBS; 2002.
- [29] Société Française de Microbiologie. Examen bactériologique des sécrétions bronchopulmonaires chez un patient mucoviscidose. Rémic. Vivactis Plus; 2007 pp 35–8.
- [30] Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000;16:749–67.
- [31] Knudsen PK, Olesen HV, Hoiby N, Johannesson M, Karpati F, Laerum BN, et al. Differences in prevalence and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis centres in Denmark, Norway and Sweden. *J Cyst Fibros* 2009;8:135–42.
- [32] Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2003;2:29–34.
- [33] Bremont F, Recco P, Linas MD, Seguela JF, Dutau G. Mycoses bronchopulmonaires et mucoviscidose. *Revue Française des Laboratoires* 1993;249:115–8.
- [34] Bremont F, Rittie JL, Rance F, Juchet A, Recco P, Linas MD, et al. Aspergillase bronchopulmonaire allergique chez l'enfant. *Arch Pediatr* 1999;6(Suppl 1):87S–93S.
- [35] Edwards LJ. Modern statistical techniques for the analysis of longitudinal data in biomedical research. *Pediatr Pulmonol* 2000;30:330–44.
- [36] Kraemer R, Baldwin DN, Ammann RA, Frey U, Gallati S. Progression of pulmonary hyperinflation and trapped gas associated with genetic and environmental factors in children with cystic fibrosis. *Respir Res* 2006;7:138.
- [37] Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nubling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses* 2003;46:19–23.
- [38] Hutcheson PS, Knutsen AP, Rejent AJ, Slavin RG. A 12-year longitudinal study of *Aspergillus* sensitivity in patients with cystic fibrosis. *Chest* 1996;110:363–6.
- [39] de Vrankrijker AM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stelato RK, Willems RJ, Bonten MJ, et al. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1381–6.

Cette étude présente une des premières évaluations de l'impact de la sensibilisation, d'une part, et du portage persistant d'*A. fumigatus*, d'autre part, sur le VEMS des patients pédiatriques et adultes atteints de mucoviscidose. Alors que les paramètres biologiques étudiés indépendamment les uns des autres ne semblent pas avoir d'influence sur le VEMS, les entités cliniques prenant en compte ces paramètres simultanément, c'est-à-dire la sensibilisation, le portage persistant et l'ABPA, sont, chacune, significativement associées à une baisse plus importante du VEMS que dans le groupe indemne de maladies aspergillaires. Ces résultats confortent notre hypothèse qui supposait que la présence d'*A. fumigatus* dans une expectoration ne doit pas être prise en compte isolément mais en fonction des éléments clinico-biologique qui l'accompagnent, afin de constituer une entité clinique et d'en évaluer sa pathogénicité.

2. Facteurs prédictifs d'une sensibilisation aspergillaire

La prévalence annuelle de la colonisation par *A. fumigatus* et de l'ABPA a récemment augmenté chez les enfants atteints de mucoviscidose.¹⁵³ Dans l'étude précédente, nous avons identifié *A. fumigatus* comme étant un pathogène à prendre en compte chez les patients qui présentaient une ABPA mais aussi chez les patients présentant une sensibilisation ou un portage persistant d'*A. fumigatus*. Jusqu'à présent, peu d'études^{95,154,155} ont été menées à la recherche des facteurs prédictifs de maladie aspergillaire. Sachant que la sensibilisation, d'une part, et le portage persistant, d'autre part, sont délétères pour la fonction respiratoire, et qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de critères de diagnostic consensuels permettant une standardisation de la prise en charge de ces patients, il nous a paru important de rechercher l'existence de facteurs permettant de prédire la survenue de ces états respectifs. Afin d'identifier de potentiels facteurs prédictifs de sensibilisation à *A. fumigatus*, nous avons mené une étude de survie au sein de notre cohorte toulousaine avec comme variable d'intérêt la survenue d'une

sensibilisation c'est-à-dire l'apparition d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* dans le sérum des patients.

Les données enregistrées dans le dossier informatisé du patient dédié au suivi des patients atteints de mucoviscidose ont été exploitées sur une période allant de janvier 1995 à juillet 2007. Seuls les patients suivis depuis le début de leur maladie ont été inclus dans l'étude. La base de données contenait toutes les données enregistrées par le médecin à chaque visite du patient. Des données démographiques (date de naissance, sexe), médicales (date du diagnostic, mutation génétique,^{51,142-144} indice de masse corporelle,¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ VEMS¹⁴⁸) et biologiques (dosage des IgE totales, dosage des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*, présence d'anticorps précipitants anti-*A. fumigatus*, présence de *P. aeruginosa*,¹⁴⁹ colonisation par *P. aeruginosa*,^{86,150} détection transitoire de *A. fumigatus*, culture positive persistante d'*A. fumigatus*¹⁵¹) ont été recueillies. Les patients ont été divisés en deux groupes en fonction des résultats des examens mycologiques et immunologiques. La classification des maladies aspergillaires a été inspirée par les résultats du précédent travail :

- Sensibilisés : IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* > 0,35 UI/mL et IgE totales < 500 UI/mL
- Porteurs transitoires ou persistants : IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* ≤ 0,35 UI/mL, avec soit une culture positive à *A. fumigatus* transitoire ou persistante soit une IER ≥ 3 arcs^{14,15} avec au moins une culture positive pour *A. fumigatus*

Cent dix-sept patients ont été vus au cours de 3080 consultations de pédiatrie sur une période allant du 1^{er} janvier 1995 au 3 juillet 2007. A la fin de l'étude, 50 (42,7%) de ces patients ont été identifiés comme étant sensibilisés vis-à-vis d'*A. fumigatus*. L'âge médian d'apparition des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* était de 5 ans (IQR [4,2 ; 9,7]). Quarante-cinq patients ont été identifiés comme porteurs persistants ou transitoires d'*A. fumigatus* et considérés comme groupe témoin. Les 22 patients restants n'ont jamais présenté aucun signe de maladie

aspergillaire et n'ont donc pas été inclus dans l'analyse. L'analyse statistique¹⁵⁶ des 95 patients porteurs d'une maladie aspergillaire a montré que :

- l'existence d'une mutation sévère de la protéine CFTR, un niveau initial de VEMS supérieur à 70% de la valeur théorique, une absence de colonisation par *P. aeruginosa*, une absence d'activité catalasique lors de la recherche d'anticorps précipitants anti-*A. fumigatus* et une absence de prescription d'azithromycine étaient des facteurs prédictifs indépendants de sensibilisation,
- nous pouvions proposer une frise chronologique de la survenue des événements chez les patients atteints de mucoviscidose et sensibilisés à *A. fumigatus*.
- nous pouvions proposer un algorithme de calcul de risque de la sensibilisation à *A. fumigatus*

Aspergillus Sensitization or Carriage in Cystic Fibrosis Patients

Judith Fillaux, MD,*† François Brémont, MD,‡§ Marlène Murris, MD,§¶ Sophie Cassaing, PhD,*†
Laurent Tétu, MD,§¶ Christine Segonds, MD,|| Bernard Pipy, PhD,† and Jean-François Magnaval, PhD*

Background: *Aspergillus fumigatus* (Af) sensitization and persistent carriage are deleterious to lung function, but no consensus has been reached defining these medical entities. This work aimed to identify possible predictive factors for patients who become sensitized to Af, compared with a control group of non-sensitized Af carriers.

Methods: Between 1995 and 2007, 117 pediatric patients were evaluated. Demographic data, CFTR gene mutations, body mass index and FEV₁ were recorded. The presence of Af in sputum, the levels of Af-precipitin, total IgE (t-IgE) and specific IgE to Af (Af-IgE) were determined. Patients were divided into 2 groups: (1) "sensitization": level of Af-IgE > 0.35 IU/mL with t-IgE level < 500 IU/mL and (2) "persistent or transient carriage": Af-IgE level ≤ 0.35 IU/mL with either an Af transient or persistent positive culture. A survival analysis was performed with the appearance of Af-IgE in serum as an outcome variable.

Results: Severe mutation (hazard ratio = 3.2), FEV₁ baseline over 70% of theoretical value (hazard ratio = 4.9), absence of *Pa* colonization, catalase activity and previous azithromycin administration (hazard ratio = 9.8, 4.1 and 1.9, respectively) were predictive factors for sensitization. We propose a timeline of the biological events and a tree diagram for risk calculation.

Conclusions: Two profiles of cystic fibrosis patients can be envisaged: (1) patients with nonsevere mutation but low FEV₁ baselines are becoming colonized with Af or (2) patients with high FEV₁ baselines who present with severe mutation are more susceptible to the Af sensitization and then to the presentation of an allergic bronchopulmonary aspergillosis event.

Key Words: cystic fibrosis, fungal infection, sensitization, predictive factors

(*Pediatr Infect Dis J* 2014;XX:00–00)

Cystic fibrosis (CF) is 1 of the most common life-shortening autosomal-recessive diseases in Caucasians, affecting 1 in 2500 individuals.¹ Chronic endobronchial infection with CF-related pathogens and the associated neutrophil-dominated airway inflammation contribute to progressive obstructive pulmonary disease.² The presence of *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) and other pathogens in the lower airway is hypothesized to increase the host inflammatory response and thereby accelerate the process of airway damage.³ *Aspergillus fumigatus* (Af) is a ubiquitous fungus that grows in humid environments and on decaying organic waste.

Af is a pathogen that causes a wide range of pulmonary disease states that are not restricted to CF patients. One of these diseases, allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), is particularly frequent in CF patients, with a prevalence ranging from 2% to 25%.^{4–7} Furthermore, the annual prevalence of *Aspergillus* colonization and ABPA has recently increased in CF pediatric patients.⁸ In patients with CF, the clinical, imaging and laboratory parameters are influenced by the underlying disease; therefore, the diagnosis of Af-related diseases remains difficult. In a previous study,⁹ we have determined, as have others,^{10,11} that Af may be of clinical relevance among individuals with CF who do not exhibit typical manifestations of ABPA but who do exhibit manifestations of Af sensitization or persistent carriage. In the literature, the prevalence of specific IgE to Af ranged from 31% to 65%.^{9,12,13} To date, no correlation has been found between the identification of Af in the sputum and the presence of specific IgE to Af or between sensitization and colonization, a point that suggests that 2 distinct pathologic entities could exist.^{12,13} Three studies^{14–16} have investigated the predictive factors for ABPA or colonization or sensitization with Af. A novel classification has been proposed based upon the results from immunological investigations including the dosage of galactomannan antigen and real-time quantitative polymerase chain reaction detection of Af in CF sputum.¹⁷ However, diagnostic criteria based on both medical history and clinical and biological findings to distinguish between the different diseases caused by Af in CF patients are still lacking.

Both Af sensitization and chronic carriage are deleterious to lung function, but currently no consensual definitions of these medical entities are available. The presented study reports the results of the investigation in a cohort of patients followed at the CF reference centre at the Toulouse University Hospital that was carried out as a survival analysis using the moment of appearance in the serum of specific IgE to Af as an outcome variable. This work aimed to identify possible predictive factors indicating that a given patient would become sensitized to Af compared with a control group of nonsensitized Af carriers.

MATERIALS AND METHODS

From January 1995 to July 2007, the details of the patients with CF at the Toulouse Cystic Fibrosis Resources and Competence Centre of the Toulouse University Hospitals were entered into a database. The CF diagnosis relied upon the detection of an iontophoretic sweat chloride level of 60 mEq/L or greater.^{18,19} Only patients followed from the time of CF diagnosis were included in the study. The database contained all data collected by physicians during each patient's visit, which occurred twice per year or more frequently if necessary. After the patients had received detailed information on the purpose of establishing this database, they gave their written consent for any electronic medical use of their information. Management of the database complied with French regulations regarding the protection of the privacy of patient information (Commission Nationale Informatique et Libertés, Data Protection Statement No. 1203335). Patients lost to follow-up, those who died and those who were transferred to another medical centre were evaluated based on our most recent information.

Accepted for publication December 3, 2013.

From the *Service de Parasitologie—Mycologie, IFB, Hôpital Purpan; †UMR152, Université Toulouse III; ‡Service de Pneumologie Allergologie, Hôpital des Enfants; §Centre de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose (CRCM) enfant et adulte; ¶Service de Pneumologie Allergologie, Hôpital Larrey; and ||Laboratoire de Bactériologie—Hygiène, Hôpital Purpan, Toulouse, France.

J.F. and S.C. are members of the ISHAM Working Group investigating "Fungal respiratory infection in cystic fibrosis". F.B. and M.M. are the heads of the Toulouse Cystic Fibrosis Resources and Competence Centre for paediatric and adult cystic fibrosis patients, respectively.

The authors have no conflicts of interest or funding to disclose.

Address for correspondence: Judith Fillaux, Service de Parasitologie—Mycologie, IFB, Hôpital Purpan, 31059 Toulouse, France. E-mail: fillaux.j@chu-toulouse.fr.

Copyright © 2014 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0891-3668/14/XXXX-0000

DOI: 10.1097/INF.0000000000000231

Demographic and Medical Characteristics

Date of birth, gender, date of diagnosis and CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations were entered into the database. As previously reported,^{20–23} the “severe/mild mutation” classification system²⁴ was used, and CFTR gene mutations were classified as “mild mutations” (classes IV and V, associated with residual CFTR function) or “severe mutations” (classes I to III, equivalent to the “null” mutation consequence, including patients with pancreatic insufficiency).

Body mass index values and forced expiratory volumes during the first second of expiration (FEV₁) were recorded at each visit. Body mass index classes (underweight/normal weight) were determined using French age- and sex-specific curves if the age was <18 years^{25–27} and using international cut-off points for adults if the age was >18 years. FEV₁ results were expressed as predicted percentages based on the accepted reference standard.²⁸ The result of the first FEV₁ recorded on the subject yielded the FEV₁ baseline.

Laboratory Investigations

Expectorated or induced sputum was collected at each visit and tested for the presence of *Af* and *Pa*. *Af* was identified on the basis of macroscopic and microscopic examination of the culture²⁹ after the inoculation of vials containing Sabouraud-chloramphenicol-gentamicin agar medium (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette France). *Pa* was identified according to the national recommendations for CF specimens.³⁰ Chronic infection by *Pa* was defined as the presence of the pathogen in the bronchial tree for at least 6 months, based on at least 3 positive cultures taken at intervals of at least 1 month.^{31,32} For *Af*, the same definition was used, but the term “persistent positive culture” was chosen because it is clinically impossible to distinguish between colonization and infection. Positive detection without an *Af* persistent positive culture or *Pa* colonization was defined as transient detection for *Af* and *Pa*, respectively. The Leeds criteria³³ could not be applied because approximately 50% of the patients had <4 visits a year. As a consequence, these patients would have remained unclassifiable.

The presence of precipitating antibodies to *Af* (*Af*-precipitin) was detected using immunoelectrophoresis (IEP; Beckman Instruments, CA and Sebia, Evry, France)³⁴ against *Af* antigenic extracts and metabolites (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The lines supporting the catalase activity were revealed by immersing the gels for a few seconds in 3% hydrogen peroxide.³⁵ The levels of serum total IgE (t-IgE) and specific anti-*Af* IgE (*Af*-IgE) were assessed by fluoro-enzyme immunoassay using an ImmunoCap automated system (Phadia, Montigny-le Bretonneux, France). All laboratory data were verified from the database handled by the management software used in the laboratories of bacteriology, mycology or immunology.

Patients were divided into groups according to the results of the laboratory investigations. The chosen classification of the *Af*-induced diseases was based upon the findings of a previous study.⁹ Patients in the “sensitization” group displayed a level of *Af*-IgE >0.35 IU/mL along with a t-IgE dosage <500 IU/mL. The characteristics of the “persistent or transient carriage” group were the combination of an *Af*-IgE level ≤0.35 IU/mL with either an *Af* transient or persistent positive culture or the detection of *Af*-precipitin ≥3 lines,^{36,37} provided that this serologic finding was associated with an *Af* detection, at least once.

Statistical Analysis

The characteristics of the studied population were described using percentages and median along with interquartile ranges instead of means and standard deviations when distributions were found to be non-Gaussian. Only patients followed since the

beginning of the disease were included in the study. To identify predictive factors for positive *Af*-IgE, a survival analysis was performed. Each variable was tested according to the log-rank test for survivor functions, in which the analysis time was the duration before becoming sensitized. Failure was defined as the detection of *Af*-IgE. Then, a multivariate analysis (Cox proportional hazard model)³⁸ was performed with a step-by-step descending method to determine factors associated with the occurrence of sensitization. Only variables found to be significant in the bivariate analysis with $P < 0.20$ were tested in the Cox model. A test and a graph based on the Schoenfeld residuals were used to check the proportional hazards assumption of the Cox model. The relative hazards (HRs) and 95% confidence intervals were used to describe predictive factors ($P < 0.05$). All statistical tests and procedures were performed using the Intercooled Stata 9.2 statistical package (StataCorp, College Station, TX).

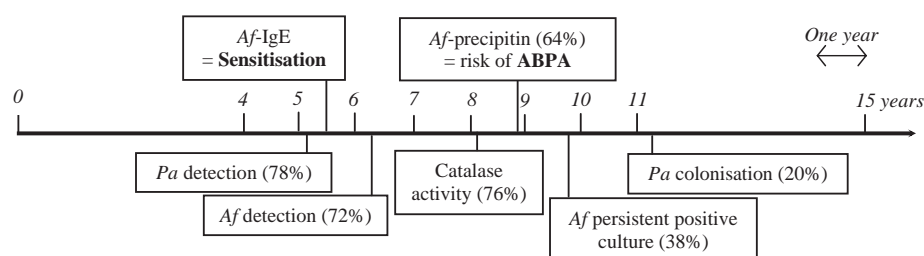
RESULTS

Description of Patients and Visits

From January 1, 1995, to July 3, 2007, 117 pediatric patients, followed since the beginning of their illness, were cumulatively evaluated 3080 times. No patient died during the study period, 5 were transferred to another medical center and 3 were lost to follow up. At the end of the study, 50 patients (42.7%) were classified in the “sensitization” group. Among them, 4 patients (3.4% of the total population) presented at least once with an ABPA episode (according to the Cystic Fibrosis Foundation consensus conference).³⁹ Forty-five patients (38.5%) had been classified in the “persistent or transient carriage” group without any *Af*-IgE positive level. The “persistent or transient carriage” group was considered the control group. The remaining 22 patients (18.8%) never presented with *Af*-IgE >0.35 IU/mL, precipitin-*Af* ≥3 lines nor *Af* detection during the entire study period and thus were excluded from the analysis. The demographic and medical characteristics of the study population ($n = 95$) are summarized in Table 1.

TABLE 1. Characteristics of the Study Population

	Total (N = 95)
	Median [Interquartile Ranges]
Age at CF diagnosis (months)	16.9 [1.8–49.2]
Age at the end of the study (years)	9.9 [6.0–13.2]
Follow-up duration (years)	4.7 [2.7–9.3]
Number of visits per patient	24 [14–39]
Baseline FEV ₁ (%)	95 [80–106]
	N (%)
Sex (male)	53 (55.7)
Severe mutation	70 (75.3)
CFTR mutation	
ΔF508/ΔF508	40 (42.1)
ΔF508/other	41 (43.2)
Other/other	12 (12.6)
Incomplete or unknown genotype	2 (2.1)
Diagnosis known at birth	6 (6.3)
At least 1 sputum examination positive for <i>Pa</i>	
Carriage group (n = 45)	29 (64)
Sensitization group (n = 50)	39 (78)
At least 1 sputum examination positive for <i>Af</i>	
Carriage group (n = 45)	43 (96)
Sensitization group (n = 50)	36 (72)
At least 1 ABPA episode	4 (4.2)



Af-IgE: positive ≥ 0.35 UI/mL; **Af-precipitin:** positive ≥ 3 lines; **Pa colonisation or Af persistent positive culture:** presence of the pathogen in the bronchial tree for at least six months, based on at least three positive cultures at intervals of at least one month.

FIGURE 1. Percentages for events in the “sensitization” group and hypothetical timeline of disease progression.

Laboratory Investigations Results According to the 2 Groups

In the “sensitization” group, the isolation of *Af* from a respiratory sample occurred in 72% of the patients; this percentage was significantly lower than that of the “persistent or transient carriage” group (96%, $P = 0.047$). Catalase activity was significantly more frequently observed in the “sensitization” group followed since their CF diagnosis (76% versus 38% in the “persistent or transient carriage” group, $P < 0.001$). *Pa* colonization tended to occur more frequently in the “sensitization” group but the association was not significant ($P = 0.08$). The first detection of *Af*-IgE occurred earlier than the first *Pa* colonization episode ($P < 0.001$). Conversely, the first *Pa*-positive sputum occurred earlier than the first detection of *Af*-IgE ($P < 0.002$). When the sensitized patients presented with *Pa*-positive sputum, this event occurred earlier than the first positive *Af* sputum ($P = 0.029$), the first positive *Af* sputum occurred earlier than the first *Pa* colonization episode ($P < 0.001$), and there was no difference between the age of occurrence of *Pa* colonization and of *Af* colonization.

In the “persistent or transient carriage” group, when the patients presented with both *Pa*- and *Af*-positive sputum or with both *Pa* and *Af* colonization, there was no difference between the *Pa*- and *Af*-positive sputum or the *Pa* and *Af* colonization in terms of the frequency or age of the first episode. In both groups, when patient sample were positive for catalase activity, this positivity occurred before the emergence of *Af*-precipitin ≥ 3 lines. From these results, we constructed a timeline of these infectious events for the “sensitization” group (Fig. 1).

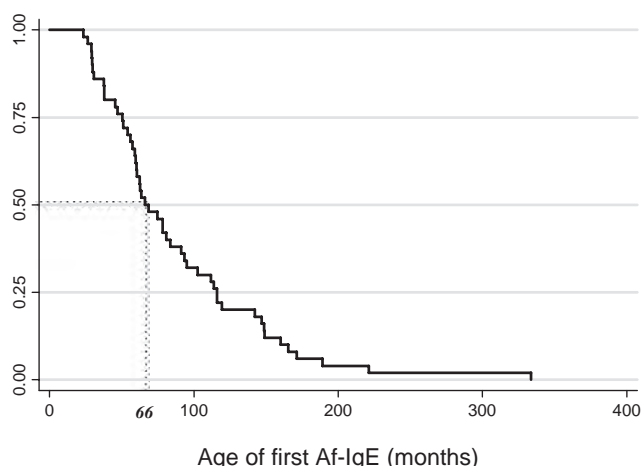


FIGURE 2. Kaplan-Meier curves for time to the first detection of *Af*-IgE.

Predictive Factors for Af Sensitization

As shown in Figure 2, the median age of the first *Af*-IgE was 66 months [ie, 5 years (4.2–9.7)]. In bivariate analysis, as shown in Figure 3, the age at the time of first detection of *Af*-IgE (median, interquartile ranges) was associated with the following:

- The presence of a severe mutation: 93 (59–165) months for severe mutation versus 221 (119 to >500) months for nonsevere mutation.
- The absence of *Af* detection: 62 (47–114) months for no *Af* detection versus 171 (112–334) months for *Af* detection.
- The absence of *Pa* colonization: 66 (50–116) months for no *Pa* colonization versus >500 months for *Pa* colonization.
- The absence of catalase activity: 60 (37–102) months for no catalase activity versus 333 (116 to >500) months for catalase activity.
- The absence of azithromycin therapy: 91 (51–149) months for no azithromycin therapy versus 165 (83–333) months for azithromycin therapy.

Although not significantly associated with the appearance of *Af*-IgE, FEV₁ baseline, body mass index and *Af*-precipitin were introduced in the multivariate analysis because the P -value of the association in bivariate analysis was <0.20 . Neither itraconazole nor inhaled or systemic corticosteroids prescriptions were associated with *Af* sensitization.

After, Cox analysis (Table 2), the severe mutation patients were almost 3.2 times more susceptible to sensitization than the nonsevere mutation patients ($P = 0.022$). The patients with a FEV₁ baseline over 70% of the theoretical value were 4.9 times more susceptible to sensitization than the patients with a FEV₁ baseline under 70% ($P = 0.001$). The patients without *Pa* colonization were 9.8 times more susceptible to sensitization than the patients with *Pa* colonization ($P < 0.001$). The patients without catalase activity were 4.1 times more susceptible to sensitization than the patients with catalase activity ($P < 0.001$). The patients who never received azithromycin were 1.9 times more susceptible to sensitization than the patients who received azithromycin ($P < 0.038$). The interactions between the independent variables were tested but not significant. Figure 4 shows the risk calculation for a CF patient to become sensitized to *Af* according to the presence or absence of the predictive factors.

DISCUSSION

To our knowledge, this analysis of a 12-year observational cohort, which was maintained in the Toulouse University Hospital, France, is 1 of the rare studies assessing the clinical and biological predictive factors for sensitization to *A. fumigatus* in pediatric CF patients. This study makes 2 important contributions to the field.

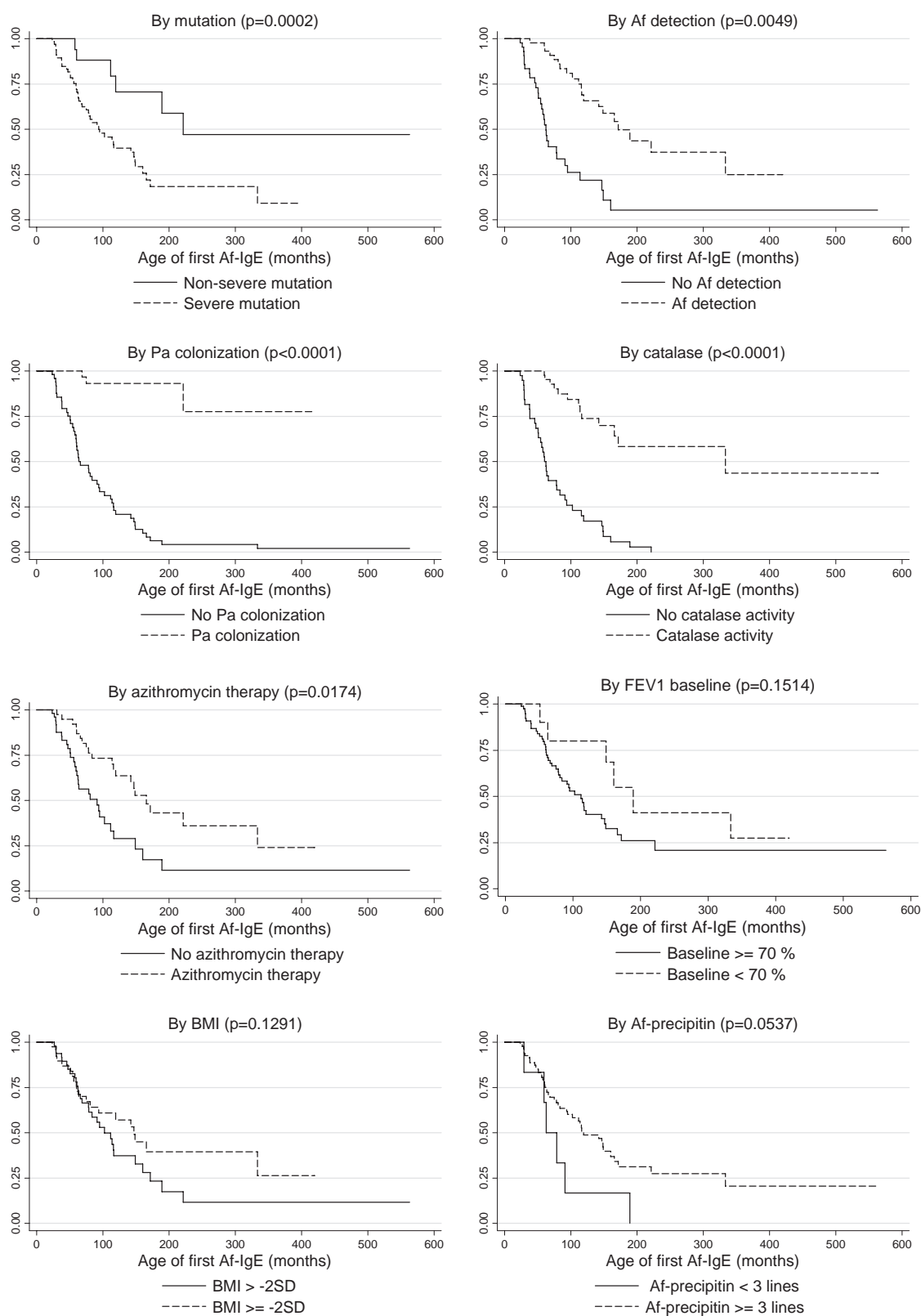


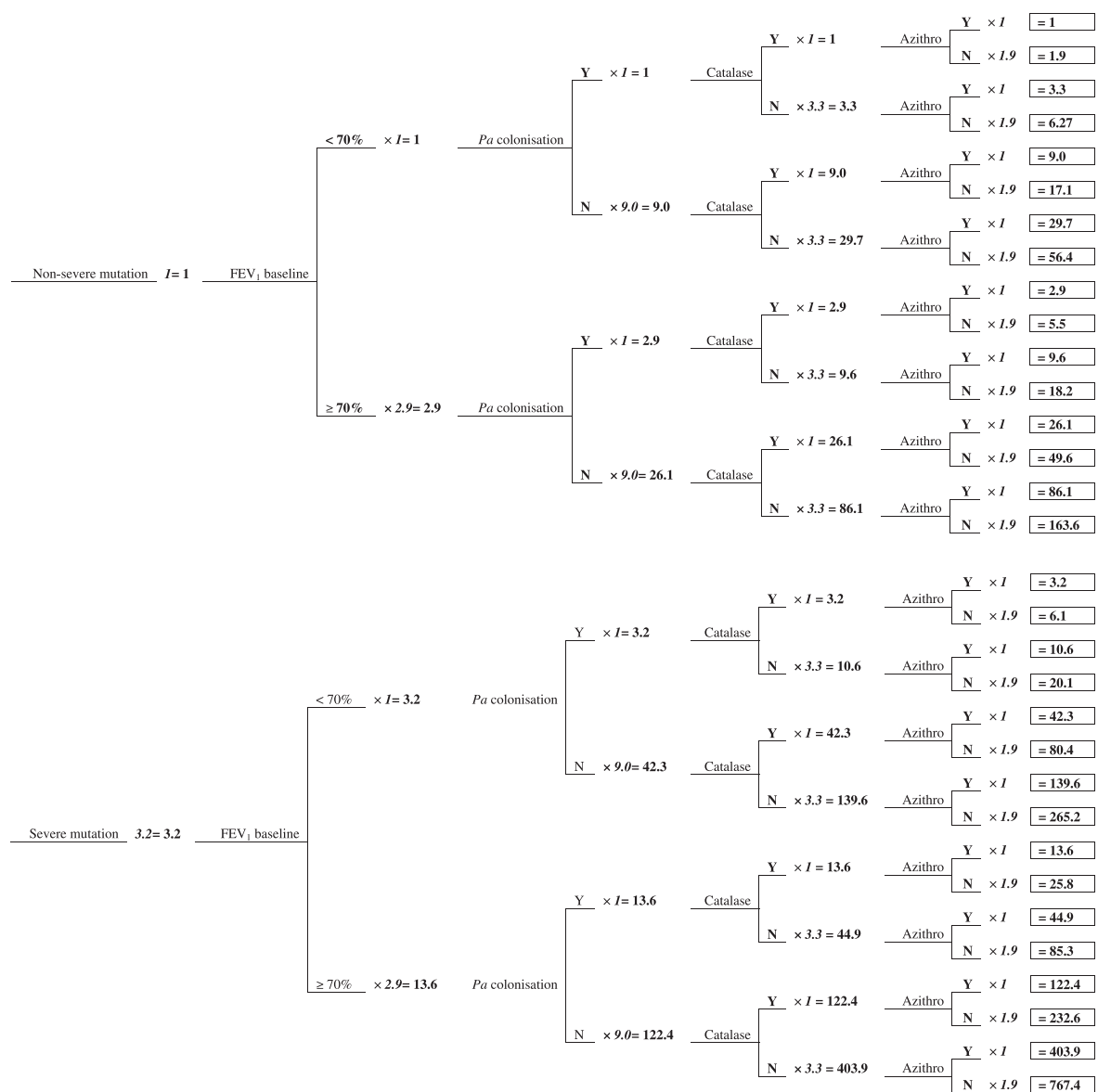
FIGURE 3. Bivariate analysis: Kaplan-Meier curves and log-rank tests for time to first detection of *Af*-IgE.

TABLE 2. Multivariate Analysis: Relative Hazard for Time to Positive *Af*-IgE (N = 93)

		Patient N (%)	Hazard Ratio	95% Confidence Interval
Severe mutation	No	23 (25)	1	
	YES	70 (75)	3.2	(1.2–8.9)
FEV ₁ baseline	<70 %	10 (11)	1	
	≥70 %	83 (89)	4.9	(1.8–13.0)
<i>Pa</i> colonization	Yes	43 (46)	1	
	No	50 (54)	9.8	(2.8–34.1)
Catalase activity	Yes	55 (59)	1	
	No	38 (41)	4.1	(1.9–8.9)
Azithromycin	Yes	38 (41)	1	
	No	55 (59)	1.9	(1.1–3.6)

First, a correlation was observed between *Af* detection, catalase activity, *Pa* detection, *Pa* colonization and *Af*-IgE in terms of the frequency and the age of the first occurrence, and a timeline of these infectious events for the “sensitization” group was proposed. Second, the severity of the mutation, high FEV₁ baseline, absence of catalase enzymatic activity, absence of colonization by *P. aeruginosa* and absence of azithromycin prescriptions were independently and significantly associated with a lower age of sensitization, and a tree diagram for risk calculation was proposed.

In the “sensitization” group, the isolation of *Af* from a respiratory sample occurred significantly less frequently than in the “persistent or transient carriage” group. This finding reinforces the assumption of the existence of 2 distinct *Af*-related diseases.^{9–12} The permanent nature of the occurrence of the *Af* sensitization has been demonstrated among the CF patients managed in the Toulouse

**FIGURE 4.** Risk calculation for a CF patient to become sensitized according to the presence or absence of the predictive factors.

University Hospital.⁹ Furthermore, in the work presented here, the sensitization to *Af* appeared to occur very early in the history of this *Af*-related disease. According to our findings, for most sensitized patients, the detection of *Af*-IgE will precede the detection of *Af* in sputum and of *Af*-precipitin in serum.

Ritz et al¹⁶ reported that the duration of colonization with *Pa* was a risk factor for *Af* sensitization. Conversely, we found that *Pa* colonization was not a predictive factor for and instead occurred after *Af* sensitization. While Jubin et al¹⁵ and Bargon et al¹⁴ found an association between azithromycin therapy and colonization or between corticosteroid prescriptions and sensitization, we found, in contrast, that a lack of azithromycin prescription was a predictive factor for sensitization. Azithromycin, similarly to other members of the macrolide group, is known to exert an antiinflammatory action onto the respiratory tract.⁴⁰ The clinical efficacy of azithromycin on pulmonary exacerbations in CF patients not infected with *Pa* has been recently established,^{41–44} and very few data are available concerning the underlying mechanisms of the antiinflammatory action in relation with CF. With regard to the association between a severe mutation and the occurrence of *Af* sensitization, the literature provides scarce information and suggests only a relationship between the CFTR mutation and the occurrence of ABPA.^{45–47}

Baxter et al¹⁷ proposed a novel classification system for CF patients based upon the results of 2 new methods to detect *Af* in CF sputum. They used a sensitive diagnostic tool, namely RT-polymerase chain reaction, and a dosage of galactomannan antigen to detect *Af* in the sputum of CF patients. In terms of serologic assays, these authors searched for the IgE and IgG specific to *Af* using the ImmunoCap system, which is more standardized than IEP. Baxter et al¹⁷ determined cut-off points for these methods to classify patients into “nondiseased” CF patients, serologic ABPA, *Aspergillus* Ig-sensitized patients and *Aspergillus* airway infection/“bronchitis”. Albeit clear, this proposal of classification was questionable on several points. For instance, the polymerase chain reaction was unable to discriminate between the conidial and the hyphal forms of the filamentous fungus, including *Af*. However, various enzymes are produced during fungal growth and play an important role in the defense of the fungus against the host’s response. For example, catalases, that detoxify hydrogen peroxides, are produced by various cells. There are 3 types of catalases^{48,49}: 1 is produced by conidia but plays no protective role against the oxygenated compounds; the other 2, described as slow and fast, are produced by mycelia and provide partial protection against the activity of leukocytes. The slow hyphal catalase activity revealed during IEP³⁵ is considered to be a virulence factor because it protects the fungus against neutrophils. In our centre, IEP is routinely used for the diagnosis of *Af*-related diseases in CF or non-CF patients. The presence of the catalase activity is an argument for the invasive presentation of the fungus. Such results are not provided by available automated techniques. In this study, when patients presented with both catalase activity and *Af*-precipitin ≥ 3 lines, the catalase activity (carried by 1 line) preceded the appearance of the 3 lines. Another concern was that the combination of methods used in this study was quite expensive and may not be considered as a routine diagnostic strategy for most centers specialized in CF management. Finally, it should also be emphasized that Baxter et al’s¹⁷ classification was unable to sort all patients and that 16 of 146 did not fall into any group.

It should be noted that our study included only 1 centre. Nevertheless, our cohort was similar to those found in the literature with respect to the sex ratio,^{4,50,51} age,^{4,51,52} $\Delta F508$ mutation ratio,^{4,51} frequency of ABPA,^{4–7} frequency of *Af* colonization⁵³ and frequency of *Pa* detection.⁵⁰ Owing to the small number of cases of ABPA ($n = 4$), most likely due to the young age of the population,

we chose not to analyze this group separately from patients sensitized to *Af*. Despite these limitations, the hypothetical course of the events we designed and the tree diagram we propose for risk calculation of sensitization could be helpful for use in routine diagnosis.

According to our findings, 2 profiles can be envisaged for CF patients: (1) patients with a non-severe mutation but low FEV₁ baselines become colonized by *Af* because of an alteration in their pulmonary function and impairment in the clearance of the pathogenic microorganisms or (2) patients with high FEV₁ baselines who present with severe mutation are more susceptible to the *Af* sensitization, then to the presentation of an ABPA event.

Further studies are therefore required to improve the standardization of the diagnostic tools^{12,54} and to identify and ascertain the diagnostic criteria of the 2 novel *Af*-related diseases that are sensitization and persistent carriage. Without consensus regarding diagnostic criteria, recommendations for the management of these patients cannot be formed.

REFERENCES

1. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, et al. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest*. 2004;125(suppl 1):1S–39S.
2. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:918–951.
3. Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, et al.; Inhaled Tobramycin in Young Children Study Group; Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Development Network. Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2009;154:183–188.
4. Bellis G, Cazès MH, Fuhrman C, et al. *Cystic fibrosis French Registry—Report 2006*. Paris: Vaincre la Mucoviscidose & Ined; 2009.
5. Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:685–692.
6. Mastella G, Rainisio M, Harms HK, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2001;17:1052–1053.
7. Thia LP, Balfour Lynn IM. Diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2009;10:37–42.
8. Skov M, McKay K, Koch C, et al. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis in an area with a high frequency of atopy. *Respir Med*. 2005;99:887–893.
9. Fillaux J, Brémont F, Murris M, et al. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis*. 2012;44:842–847.
10. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, et al. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2010;137:171–176.
11. Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, et al. *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006;130:222–226.
12. Baxter CG, Moore CB, Jones AM, et al. IgE-mediated immune responses and airway detection of *Aspergillus* and *Candida* in adult cystic fibrosis. *Chest*. 2013;143:1351–1357.
13. Máiz L, Cuevas M, Quirce S, et al. Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2002;121:782–788.
14. Bargon J, Daulebaev N, Köhler B, et al. Prophylactic antibiotic therapy is associated with an increased prevalence of *Aspergillus* colonization in adult cystic fibrosis patients. *Respir Med*. 1999;93:835–838.
15. Jubin V, Ranque S, Stremmler Le Bel N, et al. Risk factors for *Aspergillus* colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45:764–771.
16. Ritz N, Ammann RA, Aebischer CC, et al. Risk factors for allergic bronchopulmonary aspergillosis and sensitization to *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr*. 2005;164:577–582.
17. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:560–566.e10.
18. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al.; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008;153:S4–S14.

19. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959;23:545–549.
20. de Gracia J, Mata F, Alvarez A, et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2005;60:558–563.
21. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, et al. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2003;361:1671–1676.
22. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet*. 2003;67(pt 5):471–485.
23. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000;67:117–133.
24. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008;7:179–196.
25. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000;320:1240–1243.
26. INPES. Courbes enfants 2006. Available at: http://www.inpes.sante.fr/50000/pdf/courbes_enfants.pdf. Accessed May 27, 2009.
27. Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempé M, et al. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr*. 1991;45:13–21.
28. Wang X, Dockery DW, Wypij D, et al. Pulmonary function between 6 and 18 years of age. *Pediatr Pulmonol*. 1993;15:75–88.
29. Klich MA. Identification of Common *Aspergillus* Species. Utrecht: CBS; 2002.
30. Société Française de Microbiologie. Examen bactériologique des sécrétions bronchopulmonaires chez un patient mucoviscidosique. In: Alinea, ed. *Rémic*. Paris: Vivactis Plus; 2007:35–38.
31. Döring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*. 2000;16:749–767.
32. Knudsen PK, Olesen HV, Højby N, et al.; Scandinavian CF Study Consortium (SCFSC). Differences in prevalence and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis centres in Denmark, Norway and Sweden. *J Cyst Fibros*. 2009;8:135–142.
33. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, et al. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2003;2:29–34.
34. Borron F, Persat F, Borel MA, Mojon M. Evaluation de l'immunoélectrophorèse rapide Paragon (P) (Beckman) appliquée au séro-diagnostic aspergillaire. *J Mycol Med*. 1994;4:221–225.
35. Tran-van-Ky P, Torck C, Vaucelle T, et al. [Comparative study on immunoelectrophoregrams of enzymes of the antigenic extract of *Aspergillus fumigatus* revealed by experimental serums and serums of patients with aspergillosis]. *Sabouraudia*. 1969;7:73–84.
36. Bremont F, Recco P, Linas MD, et al. Mycoses bronchopulmonaires et mucoviscidose. *Revue Française des Laboratoires*. 1993;249:115–118.
37. Brémont F, Rittié JL, Rancé F, et al. [Allergic bronchopulmonary aspergillosis in children]. *Arch Pediatr*. 1999;6(suppl 1):87S–93S.
38. Langholz B, Jiao J. Computational methods for case-cohort studies. *Computat Stat Data An*. 2007;51:3737–3748.
39. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, et al.; Participants in the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis—state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003;37 (suppl 3):S225–S264.
40. Babu KS, Kastelik J, Morjaria JB. Role of long term antibiotics in chronic respiratory diseases. *Respir Med*. 2013;107:800–815.
41. Clement A, Tamalet A, Leroux E, et al. Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: A double blind, placebo controlled trial. *Thorax*. 2006;61:895–902.
42. Ratjen F, Saiman L, Mayer-Hamblett N, et al. Effect of azithromycin on systemic markers of inflammation in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*. 2012;142:1259–1266.
43. Saiman L, Anstead M, Mayer-Hamblett N, et al.; AZ0004 Azithromycin Study Group. Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010;303:1707–1715.
44. Saiman L, Mayer-Hamblett N, Anstead M, et al.; AZ0004 Macrolide Study Team. Open-label, follow-on study of azithromycin in pediatric patients with CF uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatr Pulmonol*. 2012;47:641–648.
45. Eaton TE, Weiner Miller P, Garrett JE, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations: do they play a role in the aetiology of allergic bronchopulmonary aspergillosis? *Clin Exp Allergy*. 2002;32:756–761.
46. Luisetti M, Pignatti PF. Genetics of idiopathic disseminated bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2003;24:179–184.
47. Miller PW, Hamosh A, Macek M Jr, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am J Hum Genet*. 1996;59:45–51.
48. Calera JA, Paris S, Monod M, et al. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 1997;65:4718–4724.
49. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 2003;71:3551–3562.
50. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, et al.; Scientific Advisory Group and the Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2007;151:134–9, 139.e1.
51. Kraemer R, Baldwin DN, Ammann RA, et al. Progression of pulmonary hyperinflation and trapped gas associated with genetic and environmental factors in children with cystic fibrosis. *Respir Res*. 2006;7:138.
52. Burggraef N, Branger B, Dabadie A, et al. [Longitudinal evaluation of pulmonary function tests in children with newborn screening for cystic fibrosis. Relationships with pulmonary infection. Study of 40 children undergoing 744 pulmonary function tests]. *Arch Pediatr*. 2007;14:864–869.
53. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, et al. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*. 2003;46:19–23.
54. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med Mycol*. 2010;48 (suppl 1):S88–S97.

Cette étude est une des rares ayant mis en évidence la présence de facteurs prédictifs, à la fois cliniques et biologiques, de la survenue d'une sensibilisation chez des patients atteints de mucoviscidose. Nous avons pu montrer l'existence d'une séquence d'évènements spécifiques au groupe des patients sensibilisés et nous proposons un algorithme de calcul de risque qui pourrait être utilisé pour dépister les patients susceptibles de devenir sensibilisés.

Discussion

1. Impact clinique des maladies aspergillaires

Cette étude a permis de définir de nouvelles maladies aspergillaires, la sensibilisation et le portage persistant, chez les patients atteints de mucoviscidose suivis au CHU de Toulouse.

*La sensibilisation à *A. fumigatus* a un effet délétère sur la fonction respiratoire.*

Comme dans l'étude de Kraemer,¹⁵⁷ nous avons montré que le fait d'être sensibilisé vis-à-vis d'*A. fumigatus*, qu'il y ait ou non ABPA, était associé à un déclin plus rapide de la fonction respiratoire caractérisée par le VEMS par rapport à un patient indemne de maladies aspergillaires. Nicolaï et al. rapportaient aussi l'existence d'une corrélation statistiquement significative entre la détection d'une sensibilisation vis-à-vis d'*Aspergillus sp.* (RAST et test de réaction cutanée) et la diminution des paramètres de mesures de la fonction pulmonaire dont le VEMS.¹⁵⁸ Dans la cohorte toulousaine, contrairement à l'étude de Wojnarowski,¹³² le déclin de la fonction respiratoire dû à la sensibilisation a été observé quel que soit le niveau des IgE totales. En effet, le dosage de ces dernières n'était pas un critère de classification dans le groupe des patients sensibilisés. Hutcheson¹³⁵ a démontré que ces patients pouvaient développer jusqu'à cinq paramètres de sensibilisation (tests cutanés, anticorps précipitants, IgE spécifiques, IgG spécifiques et IgE totales) sans développer d'ABPA.

Les enfants sensibilisés suivis à Toulouse présentaient significativement moins souvent d'isolement d'*A. fumigatus* dans leurs expectorations que les enfants colonisés. Jusqu'à présent aucune corrélation entre la colonisation et la sensibilisation à *A. fumigatus* n'a pu être mise en évidence.¹³⁸ Cette absence de corrélation est un argument en faveur de l'existence de deux entités médicales distinctes. Une étude plus récente¹⁵⁹ vient confirmer nos données en montrant que la sensibilisation à *Aspergillus sp.* était associée à un déclin plus important de la fonction respiratoire et à un plus grand nombre d'exacerbation pulmonaire. La sensibilisation

n'était pas associée à la détection d'*Aspergillus sp.* dans les prélèvements respiratoires effectués à visée diagnostique.

Le portage persistant d'A. fumigatus dans l'arbre respiratoire entraîne un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire .

Amin¹³⁰ a montré que l'infection persistante à *A. fumigatus* était un facteur de risque indépendant d'admission à l'hôpital pour exacerbation pulmonaire. Dans notre étude, le portage persistant d'*A. fumigatus* était associé à un déclin significatif de la fonction respiratoire des patients. A l'inverse, cette association n'avait pas été retrouvée par de Vrankrijker.¹⁶⁰ Le probable rôle pathogène d'*A. fumigatus* en l'absence d'ABPA avait déjà été évoqué par Shoseyov¹³³ qui avait constaté une amélioration de la fonction respiratoire de six patients après un traitement par antifongiques. Ces patients ne présentaient pas les critères d'ABPA bien que porteurs d'*A. fumigatus* dans leurs expectorations et ne répondaient pas aux traitements antibactériens recommandés dans leur prise en charge.

Dans une étude publiée en 2013, Baxter et al.¹⁶¹ ont proposé une nouvelle classification de l'aspergillose chez le patient adulte atteint de mucoviscidose. Les trois classes identifiées - ABPA sérologique, sensibilisation et infection/bronchite aspergillaire - étaient comparables à celles de notre étude. Chacune de ces trois classes était indépendamment associée à une diminution de la fonction respiratoire plus importante que dans le groupe indemne de maladie aspergillaire.

2. Facteurs prédictifs d'une sensibilisation aspergillaire

Le caractère définitif de la survenue d'une sensibilisation à *A. fumigatus*, définie par la présence d'un taux d'IgE spécifiques > 0,35 UI/mL, a été démontré chez les patients atteints de mucoviscidose suivis au CHU de Toulouse. De plus, une chronologie des événements a été établie et un algorithme de calcul de risque de survenue de la sensibilisation a été proposé.

La sensibilisation à *A. fumigatus* est apparue comme survenant très tôt dans l'histoire de la maladie aspergillaire et comme se pérennisant une fois installée. De plus, elle était indispensable à la survenue d'un événement ABPA. D'après nos résultats, au CHU de Toulouse, chez les patients sensibilisés, la présence des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* devraient précéder la mise en évidence directe ou indirecte d'*A. fumigatus* (culture ou anticorps précipitants). Les patients susceptibles d'avoir une ABPA devraient présenter une sensibilisation à *A. fumigatus* avant toute détection de la présence d'*A. fumigatus* (culture ou anticorps précipitants). A l'inverse, un patient porteur transitoire ou persistant d'*A. fumigatus* dans ses expectorations ne devrait pas se sensibiliser.

Contrairement à Ritz¹⁵⁵ qui a montré que la durée de la colonisation à *P. aeruginosa* était un facteur de risque de sensibilisation à *A. fumigatus*, celle-ci n'était pas un facteur prédictif dans notre étude. En effet, cette colonisation survenait significativement plus tard que la première détection d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*.

Jubin,¹⁵⁴ d'une part, et Bargon,⁹⁵ d'autre part, ont mis en évidence une association entre prescription d'azithromycine et colonisation et entre prescription de corticostéroïdes et sensibilisation. Dans la cohorte toulousaine, seule l'absence de prescription d'azithromycine a été retrouvée comme étant significativement associée à la survenue de la sensibilisation. L'azithromycine, comme les autres antibiotiques de la classe des macrolides, est connue pour l'action anti-inflammatoire qu'elle exerce sur l'arbre respiratoire.¹⁶² Son efficacité sur les exacerbations pulmonaires^{163,164} et sur les marqueurs systémiques de l'inflammation¹⁶⁵ du sujet atteint de mucoviscidose a récemment été démontrée à la suite d'essais cliniques randomisés en double aveugle. Cette efficacité a été confirmée par l'étude de suivi qui a été menée à l'issue d'un des essais cliniques.¹⁶⁶ Une étude plus récente mettait en évidence une diminution de la

détection d'*A. fumigatus* par RT-PCR et du nombre de dosages positifs pour le galactomannane dans les expectorations de patients ayant reçu une bi-antibiothérapie curative à visée anti-*P. aeruginosa* suggérant l'existence d'interactions entre ces deux pathogènes.¹⁶⁷ Ces résultats étaient en contradiction avec ceux de Jubin¹⁵⁴ et de Bargon⁹⁵ mais les traitements utilisés n'étaient pas les mêmes.

Dans la cohorte toulousaine, la présence d'une mutation sévère de la protéine CFTR (classe I à III) était associée à une survenue significativement plus précoce de la sensibilisation par rapport aux patients porteurs d'une mutation légère. A ce jour, il n'existe pas de travaux portant sur une possible corrélation entre sensibilisation et mutation de la protéine CFTR. Les études publiées évoquent l'existence d'un lien entre ABPA et mutation de la protéine, que celle-ci entraîne ou non une mucoviscidose.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ La fréquence de mutation de la protéine CFTR chez les patients, non mucoviscidosiques, atteints d'ABPA serait plus élevée que celle de la population générale.

Comme dit précédemment, Baxter a proposé une nouvelle classification basée sur les résultats immunologiques, les résultats de la RT-PCR et les résultats du dosage du galactomannane dans les expectorations des patients. De plus, un algorithme diagnostique était proposé afin de pouvoir facilement classer les patients en fonction de leur maladie aspergillaire.

Classes	Fillaux et al. ¹⁷¹	Baxter et al. ¹⁶¹
ABPA / ABPA sérologique	IEP ≥ 3 arcs (<i>ou catalase</i>) + IgE spécifiques anti-Af $> 0,35$ UI/mL + IgE totales ≥ 500 UI/mL	IgG spécifiques > 75 mg/L + IgE spécifiques anti-Af $> 3,7$ UI/mL + IgE totales > 185 UI/mL + GM $\geq 0,5$
Sensibilisation	IgE spécifiques anti-Af $> 0,35$ UI/mL + IgE totales < 500 UI/mL	IgG spécifiques ≤ 75 mg/L + IgE spécifiques anti-Af $> 2,0$ UI/mL + IgE totales ≤ 400 UI/mL + GM $< 0,5$
Portage persistant / Infection/bronchite	IgE spécifiques anti-Af $\leq 0,35$ UI/mL + culture positive à Af persistante ou IEP ≥ 3 arcs (<i>ou catalase</i>) avec au moins une culture positive pour Af	IgG spécifiques > 75 mg/L + IgE spécifiques anti-Af absente + GM $\geq 0,5$

Tableau 3 : Comparaison des critères biologiques de classification des maladies aspergillaires.

Af = *Aspergillus fumigatus*, GM = galactomannane, IEP = immunoélectrophorèse

La classification de l'étude de Baxter est intéressante car elle propose deux marqueurs diagnostiques supplémentaires, plus sensibles, et un dosage des IgG spécifiques par une méthode plus standardisée (ImmunoCap[®]) que l'immunoélectrophorèse. Cependant, aucun élément clinique ne rentre dans les critères diagnostiques et tous les patients ne peuvent pas être inclus dans un des groupes car certaines combinaisons des paramètres ne sont pas envisagées. Bien que la PCR soit probablement un outil diagnostique d'avenir, à l'heure actuelle, tous les laboratoires d'analyses médicales n'ont pas la possibilité de réaliser cette technique en routine du fait de son coût. Par ailleurs, la PCR ne permet de faire la différence entre la présence de conidies et celle de filaments dans le prélèvement. L'activité catalasique^{172,173} révélée au cours de l'immunoélectrophorèse permet de faire cette distinction et d'affirmer le caractère pathogène du champignon. Au vu de nos résultats, la présence de l'activité catalasique pourrait rentrer dans les critères de classification au même niveau que la présence d'au moins 3 arcs de précipitation sur l'IER (Tableau 3, p76).

3. Limites de l'étude

3.1 Définition des groupes de patients

Une difficulté majeure au cours de ce travail a été de définir les états « porteurs transitoires », « porteurs persistants », « colonisés » et « sensibilisés » que ce soit pour *P. aeruginosa* ou pour *A. fumigatus*.

Pour *P. aeruginosa*, il existe deux définitions de la colonisation,^{86,141,150} dont une¹⁴¹ ne pouvait pas être utilisée car elle aurait entraîné l'exclusion d'un trop grand nombre de patients. Le groupe colonisé par *P. aeruginosa* a donc été défini par la présence de la bactérie dans l'arbre bronchique pendant au moins six mois, avec mise en évidence sur trois prélèvements avec un délai d'au moins un mois entre chacun d'eux.^{86,150} Tous les patients porteurs de *P. aeruginosa* ne répondant pas à la définition de la colonisation ont alors été considérés comme « porteurs transitoires ».

Pour la colonisation par *A. fumigatus*, il n'existe pas de définition consensuelle. Dans un souci de comparabilité, il a été choisi d'utiliser la même définition que pour *P. aeruginosa*. Ces patients ont cependant été dénommés « porteurs persistants » dans l'objectif de ne pas préjuger de l'impact d'*A. fumigatus* d'autant plus que, dans le contexte de la mucoviscidose, la distinction entre colonisation et infection par ce pathogène restait floue.

Pour la sensibilisation à *A. fumigatus*, seul le critère du dosage des IgE spécifiques a été retenu en l'absence de consensus retrouvé dans la littérature.

Les difficultés rencontrées dans la définition des groupes se sont répercutées sur la possibilité de comparer les résultats des études entre elles. Les différences observées pouvaient être biaisées par les choix de définition des groupes de patients. La discordance entre les résultats de prévalence de colonisation ou d'infection par *A. fumigatus* retrouvés dans différentes études¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ a confirmé qu'en l'absence de définition consensuelle et du fait de pratiques locales différentes, aucune comparaison ne pouvait être valable. De plus, il n'existe pas de re-

commandations¹²¹ sur les méthodes de diagnostic direct à mettre en œuvre dans le contexte de la mucoviscidose. Dans une revue de littérature faite en 2013 par Liu, deux définitions étaient proposées pour la colonisation et l'infection à *Aspergillus sp.* (Tableau 4, p78).¹⁷⁷

Colonisation à <i>Aspergillus sp.</i>	Infection à <i>Aspergillus sp.</i>
(1) Isolement d' <i>Aspergillus sp.</i> dans au moins 50% des expectorations recueillies sur une période de 6 mois à 1 an	(1) Isolement d' <i>Aspergillus sp.</i> dans au moins 50% des expectorations recueillies sur une période de 6 mois à 1 an
(2) Pas de détérioration de la fonction pulmonaire	(2) Diminution des paramètres mesurant la fonction pulmonaire
(3) Pas d'exacerbation des signes respiratoires, comme la toux	(3) Exacerbation des signes respiratoires (toux)
	(4) Absence de mise en évidence d'autres pathogènes dans les expectorations
	(5) Réponse nulle ou incomplète après 4 semaines d'antibiothérapie adaptée

Tableau 4 : Proposition de définitions de la colonisation et de l'infection à *Aspergillus sp.*¹⁷⁷

Ces définitions manquent malheureusement de précision concernant les paramètres de fonction pulmonaire à évaluer et obligent à attendre quatre semaines de traitement antibiotique avant de prendre en charge la maladie aspergillaire.

3.2 Choix des méthodes pour le diagnostic immunologique

La définition des groupes sensibilisés et colonisés a reposé sur l'utilisation des techniques sérologiques (IgE spécifiques et anticorps précipitants) déjà employées pour faire le diagnostic d'ABPA.

- Dosage des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*

Le dosage des IgE spécifiques sur ImmunoCap[®] a été choisi comme témoin de la sensibilisation à *A. fumigatus* car, au CHU de Toulouse, il est réalisé au cours du suivi du patient beaucoup plus fréquemment que le prick-test. Cependant, la concordance entre les résultats des dosages des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* et les résultats des tests de réaction cutanée immédiate est variable selon les études.^{132,135,158,159,178} Bien que le dosage des IgE spécifiques présente les avantages de la reproductibilité et de la quantification, il paraît utile de poursuivre la réalisation des tests de réaction cutanée.

L'utilisation d'antigènes recombinants permet une plus grande discrimination entre patients sensibilisés et patients porteurs d'ABPA.^{179,180} Cependant, ce sont les extraits bruts d'*A. fumigatus*, pour lesquels une grande variabilité a été décrite dans les produits commercialisés, qui sont le plus souvent utilisés. Malgré cette variabilité, un résultat élevé du dosage des IgE spécifiques dirigées contre *A. fumigatus* est corrélé à l'existence d'une poussée d'ABPA chez les patients sensibilisés vis-à-vis d'*A. fumigatus*.¹⁸¹

Du fait de la non-utilisation des tests cutanés pour la recherche d'une éventuelle sensibilisation, il est possible que la prévalence de cette dernière dans la cohorte toulousaine ait été sous-estimée. Cependant, la proportion de patients sensibilisés parmi les patients suivis dans les CRCM toulousains était comparable à celles retrouvées dans la littérature.^{138,159} Le choix du seuil de positivité pour le dosage des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* est un autre élément qui rendait difficile la comparaison des études entre elles. Avec un seuil de 0,35 UI/mL dans notre étude, le groupe « sensibilisation » comprenait des patients ayant des résultats d'IgE spécifiques dans la classe 1, considérée comme peu significative. Pourtant, comme dans d'autres études,^{138,159} le VEMS diminuait significativement par rapport au groupe de patients indemnes de maladie aspergillaire, ce qui laisse supposer que des patients réellement sensibilisés n'avaient que très peu d'IgE spécifiques circulantes, phénomène bien connu en allergologie.

- Anticorps précipitants

Avant l'arrivée des techniques automatisées (ELISA, ImmunoCap[®]), la recherche d'IgG anti-*A. fumigatus* a été faite en utilisant les méthodes d'immunoprécipitation (double-diffusion d'Ouchterlony, immunoélectrophorèse et électrosynérèse). Pendant longtemps ces méthodes ont été considérées comme les techniques de référence. Plusieurs auteurs ont évalué différentes méthodes automatisées du dosage des IgG spécifiques et montrent que toutes les techniques ne sont pas équivalentes en terme de sensibilité, de spécificité et de variabilité intra- et inter-essai.^{22-24,26,182} Des protéines recombinantes et des galactomannanes purifiés ont été tes-

tés par techniques ELISA pour rechercher des anticorps anti-*Aspergillus sp.* chez des patients atteints de maladies aspergillaires dont des patients mucoviscidosiques. Concernant l'emploi de mélanges d'antigènes recombinantes, celui contenant la protéine responsable de l'activité catalasique, un marqueur du caractère pathogène du champignon incriminé, est celui qui présentait le plus grand intérêt médical.¹⁸³ Par ailleurs, Skov se pose la question de la sous-classe d'IgG à détecter et démontre qu'une combinaison des IgG1, IgG2 et IgG4 augmente la spécificité du test pour le diagnostic d'ABPA et pourrait donc être utile à l'exclusion du diagnostic.¹⁸⁴

Au CHU de Toulouse, l'IER est réalisée pour la détection et le dosage des anticorps précipitants anti-*A. fumigatus*. Les pneumologues prenant en charge les patients atteints de mucoviscidose se basent, historiquement, sur les résultats de l'IER.^{14,15} A partir de 2003, l'ELISA (Sérior/Virion®) automatisée y a été associée systématiquement. Une exploitation des résultats de cette ELISA chez les patients de la cohorte permettrait d'évaluer sa pertinence dans le diagnostic des différentes maladies aspergillaires du patient atteint de mucoviscidose. De plus, une recherche de la présence d'IgG dirigées contre *A. fumigatus* par une technique d'immunoblot, récemment commercialisée, va être évaluée au CHU de Toulouse en comparaison des techniques d'IER et d'ELISA.

3.3 Recueil des données clinico-biologiques

Une autre difficulté a été l'exploitation du dossier informatisé du patient. Bien que la saisie des données soit standardisée, devant la constatation de l'hétérogénéité de la qualité des données en fonction des patients, tous les paramètres ont dû être vérifiés et complétés auprès des Laboratoires de Bactériologie et d'Immunologie et des Services d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires, de Parasitologie – Mycologie et de Génétique Médicale. Les données concernant les durées de traitements antifongiques n'étaient pas suffisamment fiables pour être utilisées dans l'analyse statistique.

3.4 Comparabilité de la population

Malgré les limites décrites ci-dessus, il est important de souligner que la cohorte de patients atteints de mucoviscidose suivie au sein des CRCM enfant et adulte de Toulouse est comparable à celles retrouvées dans la littérature, pour les données de sex ratio,^{123,157,185} d'âge,^{123,157,186} de fréquence de la mutation Phe508del,^{123,157} de fréquence de l'ABPA,^{97,123,126,127} de fréquence de la sensibilisation,^{138,159} de fréquence de la présence persistante d'*A. fumigatus* dans les prélèvements respiratoires,⁹⁶ de fréquence de la colonisation¹³⁰ et de la détection transitoire¹⁸⁵ de *P. aeruginosa*.

Dans notre étude, un effet indépendant de la détection persistante de *P. aeruginosa* - et non de la colonisation - sur la fonction respiratoire des patients a été démontré. Cette discordance pourrait être expliquée par l'utilisation de plus en plus fréquente d'antibioprophylaxie vis-à-vis de la colonisation par *P. aeruginosa*,¹⁸⁷ depuis le début du recueil des données. L'association entre détection transitoire de *P. aeruginosa* dans les prélèvements respiratoires et déclin du VEMS a été démontrée dans d'autres études.^{157,185,186}

Dans la cohorte toulousaine, comme démontré dans d'autres études, le faible poids^{98,185} et l'âge plus élevé¹⁸⁶ étaient aussi des facteurs indépendamment associés à une altération plus importante de la fonction respiratoire.

Concernant l'influence du type de mutation sur le VEMS, contrairement à d'autres études,^{157,186} aucune association entre la sévérité de la mutation et la fonction respiratoire n'a pu être montrée chez les patients suivis au CHU de Toulouse. A l'heure actuelle, cette association reste très discutée dans la littérature.^{143,144,188}

Il est important de noter que le fait que cette étude n'ait pas été multicentrique rend les conclusions non généralisables aux patients atteints de mucoviscidose qui n'ont pas été pris en charge dans les CRCM enfant et adulte de Toulouse.

Conclusions

Malgré l'existence de quelques limites, cette étude et l'algorithme de calcul de risque pourraient être utiles à la communauté des pneumologues toulousains dans leur pratique quotidienne. En effet, comme le pensaient les médecins prenant en charge les patients atteints de mucoviscidose, il y a de plus en plus d'arguments en faveur de l'existence des maladies aspergillaires que sont la sensibilisation et le portage persistant. Cependant, la définition de ces deux entités médicales reste à standardiser afin d'en faciliter le diagnostic et d'envisager des recommandations sur la prise en charge de ces patients.

Au vu des résultats obtenus, il est possible d'envisager deux profils de patients :

- (1) les patients n'ayant pas de mutations sévères mais un VEMS initial très bas, deviennent porteurs persistants d'*A. fumigatus* à cause de l'altération de leur fonction pulmonaire et de leur incapacité à éliminer les pathogènes.
- (2) les patients, ayant un VEMS initial élevé alors qu'ils sont porteurs de mutations sévères, sont plus susceptibles de présenter une sensibilisation à *A. fumigatus* et d'évoluer vers une ABPA.

D'autres études sont indispensables afin d'homogénéiser les outils diagnostiques^{23,121} et établir un consensus pour le diagnostic de la sensibilisation, d'une part, et de la colonisation, d'autre part. Des recommandations concernant le traitement de l'ABPA ont été publiées par l'Infectious Diseases Society of America en 2008,¹²⁸ et au moins un essai clinique a déjà été réalisé sur le traitement antifongique de patients colonisés par *A. fumigatus*.¹⁸⁹ Cependant tant qu'il n'y aura pas de consensus sur les critères diagnostiques nécessaires pour la classification des patients en fonction des différentes maladies aspergillaires, il paraît vain de mettre en route des essais cliniques thérapeutiques. Les futures rencontres du groupe de travail de

l'ISHAM sur les infections fongiques seront l'occasion de mettre en place des collaborations afin d'envisager des études de plus grandes envergures.

Bibliographie

1. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999;12:310-50.
2. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Chest 2002;121:1988-99.
3. Brun S, Bouchara JP, Chabasse D. Diagnostic au laboratoire des mycoses profondes. Revue Française des Laboratoires 2004;359:33-8.
4. Chabasse D, Contet-Audonneau N. Examen direct et place de l'histologie en mycologie. Revue Française des Laboratoires 2003;357.
5. Bessières MH, Linas MD, Cassaing S. Intérêt et limites du diagnostic sérologique des mycoses. Revue Française des Laboratoires 2004;25-31.
6. Persat F, Ranque S. Intérêts et limites du sérodiagnostic fongique. La Lettre de l'Infectiologie 2009 janvier-février.
7. Kurup VP, Kumar A. Immunodiagnosis of aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1991;4:439-56.
8. Grillot R. Les mycoses humaines : démarche diagnostique. Paris: Elsevier; 1997.

9. Mogahed A, Ribeiro CD, Monjour L, Druilhe P, Carme B, Gentelini M. Etude comparative de plusieurs techniques séro-immunologiques pour le dépistage de l'aspergillose. Bull Soc Fr Mycol Med 1978;7:215-23.
10. Warnock DW. Detection of *Aspergillus fumigatus* precipitins: a comparison of counter immunoelectrophoresis and double diffusion. J Clin Pathol 1977;30:388-9.
11. Drouhet E, Camey L, Segretain G. Valeur de l'immunoprécipitation et de l'immunofluorescence indirecte dans les aspergilloses broncho-pulmonaires. Ann Inst Pasteur (Paris) 1972;123:379-95.
12. Borron F, Persat F, Borel MA, Mojon M. Evaluation de l'immunoélectrophorèse rapide Paragon[®] (Beckman) appliquée au sérodiagnostic aspergillaire. J Mycol Med 1994;4:221-5.
13. Tran-van-Ky P, Torck C, Vaucelle T, Floc'h F. Etude comparée sur immunoélectrophorégramme des enzymes de l'extrait antigénique d'*Aspergillus fumigatus*, révélés par des sérums expérimentaux et des sérums de malades atteints d'aspergillose. Sabouraudia 1969;7:73-84.
14. Bremont F, Recco P, Linas MD, Seguela JF, Dutau G. Mycoses bronchopulmonaires et mucoviscidose. Revue Française des Laboratoires 1993;249:115-8.
15. Bremont F, Rittie JL, Rance F, et al. Aspergillose bronchopulmonaire allergique chez l'enfant. Arch Pediatr 1999;6 Suppl 1:87S-93S.

16. Grillot R, Lortholary O. Nosologie : du laboratoire au malade. In: Optimed, ed. Les candidoses systémiques. Paris: Optimed; 2001:41-68.
17. Culino A, Miegerville M, Morin O. Apports de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire. *Feuillets de Biologie* 1984;XXV:51-7.
18. Senet JM, Robert R. Intérêt de l'hémagglutination dans le diagnostic de maladies parasitaires. Application à la toxoplasmose et à l'aspergillose. *Archives médicales de l'ouest* 1979;11:39-42.
19. Froudast JH, Harnett GB, McAleer R. Comparison of immunodiffusion and enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to four *Aspergillus* species. *J Clin Pathol* 1989;42:1215-21.
20. Kurup VP, Knutsen AP, Moss RB, Bansal NK. Specific antibodies to recombinant allergens of *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients with ABPA. *Clin Mol Allergy* 2006;4:11.
21. Stopiglia CD, Arechavala A, Carissimi M, et al. Standardization and characterization of antigens for the diagnosis of aspergillosis. *Can J Microbiol* 2012;58:455-62.
22. Barton RC, Hobson RP, Denton M, et al. Serologic diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis through the detection of immunoglobulin G to *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:287-91.

-
23. Baxter CG, Denning DW, Jones AM, Todd A, Moore CB, Richardson MD. Performance of two *Aspergillus* IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic and allergic aspergillosis. Clin Microbiol Infect 2013;19:E197-204.
 24. Guitard J, Sendid B, Thorez S, Gits M, Hennequin C. Evaluation of a recombinant antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2012;50:762-5.
 25. Mishra SK, Falkenberg S, Masihi KN. Efficacy of enzyme-linked immunosorbent assay in serodiagnosis of aspergillosis. J Clin Microbiol 1983;17:708-10.
 26. Van Hoeyveld E, Dupont L, Bossuyt X. Quantification of IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus* and pigeon antigens by ImmunoCAP technology: an alternative to the precipitation technique? Clin Chem 2006;52:1785-93.
 27. Chabasse D, Guiguen C, Contet-Audonneau N. Mycologie médicale. Paris: Masson; 1999.
 28. Sheppard DC. Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. Curr Opin Microbiol 2011;14:375-9.
 29. Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. Nature 2009;460:1117-21.
 30. Banerjee B, Greenberger PA, Fink JN, Kurup VP. Immunological characterization of Asp f 2, a major allergen from *Aspergillus fumigatus* associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis. Infect Immun 1998;66:5175-82.

31. Calera JA, Paris S, Monod M, et al. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1997;65:4718-24.
32. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 2003;71:3551-62.
33. Morton CO, Bouzani M, Loeffler J, Rogers TR. Direct interaction studies between *Aspergillus fumigatus* and human immune cells; what have we learned about pathogenicity and host immunity? *Front Microbiol* 2012;3:413.
34. Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* 2000;173:27-38.
35. Madan T, Eggleton P, Kishore U, et al. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun* 1997;65:3171-9.
36. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004;23:327-33.
37. Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:S113-7.
38. Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to

Aspergillus. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. J Clin Invest 1982;69:617-31.

39. Speth C, Rambach G. Complement Attack against *Aspergillus* and Corresponding Evasion Mechanisms. Interdiscip Perspect Infect Dis 2012;2012:463794.

40. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. Cell 1996;85:229-36.

41. Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. Respir Res 2000;1:54-61.

42. Israel-Biet D. Les défenses pulmonaires anti-aspergillaires. Arch Pediatr 2003;10 Suppl 5:563s-8s.

43. Speirs JJ, van der Ent CK, Beekman JM. Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med 2012;18:632-8.

44. Sun WK, Lu X, Li X, et al. Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in *Aspergillus*-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31:2755-64.

45. Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. Clin Microbiol Rev 2009;22:535-51.

46. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. J Cyst Fibros 2008;7:450-3.

47. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
48. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1229-56.
49. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest* 2004;125:1S-39S.
50. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373:1891-904.
51. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr., et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7:179-96.
52. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61:627-35.
53. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 2008;153:S4-S14.
54. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:545-9.
55. Parad RB, Comeau AM. Diagnostic dilemmas resulting from the immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm. *J Pediatr* 2005;147:S78-82.

56. Sermet-Gaudelus I, Roussel D, Bui S, et al. The CF-CIRC study: a French collaborative study to assess the accuracy of cystic fibrosis diagnosis in neonatal screening. *BMC Pediatr* 2006;6:25.
57. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005;352:1992-2001.
58. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:918-51.
59. Wine JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 1999;103:309-12.
60. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:194-222.
61. Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12088-93.
62. Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3019-23.
63. Zabner J, Smith JJ, Karp PH, Widdicombe JH, Welsh MJ. Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell* 1998;2:397-403.

64. Boucher RC. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *J Intern Med* 2007;261:5-16.

65. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 1998;95:1005-15.

66. Clunes MT, Boucher RC. Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug Discov Today Dis Mech* 2007;4:63-72.

67. Moskwa P, Lorentzen D, Excoffon KJ, et al. A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:174-83.

68. Moraes TJ, Plumb J, Martin R, et al. Abnormalities in the pulmonary innate immune system in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:364-74.

69. Machen TE. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C218-30.

70. Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:63-70.

71. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1075-82.

72. Noah TL, Black HR, Cheng PW, Wood RE, Leigh MW. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1997;175:638-47.
73. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, et al. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:121-7.
74. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2598-605.
75. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.
76. Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:257-61.
77. Venkatakrishnan A, Stecenko AA, King G, et al. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:396-403.
78. Weber AJ, Soong G, Bryan R, Saba S, Prince A. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl⁻ channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L71-8.

79. Conese M, Copreni E, Di Gioia S, De Rinaldis P, Fumarulo R. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* 2003;2:129-35.
80. Terheggen-Lagro SW, Rijkers GT, van der Ent CK. The role of airway epithelium and blood neutrophils in the inflammatory response in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005;4 Suppl 2:15-23.
81. Corvol H, Fitting C, Chadelat K, et al. Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L997-1003.
82. Saadane A, Soltys J, Berger M. Role of IL-10 deficiency in excessive nuclear factor-kappaB activation and lung inflammation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:405-11.
83. Taggart C, Coakley RJ, Grealley P, Canny G, O'Neill SJ, McElvaney NG. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L33-41.
84. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, et al. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1197-204.
85. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001;183:444-52.

86. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Respir J 2000;16:749-67.
87. West SE, Zeng L, Lee BL, et al. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. JAMA 2002;287:2958-67.
88. Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Clin Epidemiol 1995;48:1041-9.
89. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2002;34:91-100.
90. Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. J Pediatr 2001;138:699-704.
91. Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, et al. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2001;32:356-66.
92. Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, et al. Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. J Pediatr 2009;154:183-8.

93. de Bentzmann S, Roger P, Dupuit F, et al. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 1996;64:1582-8.
94. Bryan R, Kube D, Perez A, Davis P, Prince A. Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:269-77.
95. Bargon J, Dauletbaev N, Kohler B, Wolf M, Posselt HG, Wagner TO. Prophylactic antibiotic therapy is associated with an increased prevalence of *Aspergillus* colonization in adult cystic fibrosis patients. *Respir Med* 1999;93:835-8.
96. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nubling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses* 2003;46:19-23.
97. Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:685-92.
98. Van Grunderbeeck N, Conseil V, Leroy S, Wallaert B, Delhaes L. Le risque fongique dans la mucoviscidose : étude pilote. *Ann Biol Clin (Paris)* 2010;68:157-62.
99. Gangell C, Gard S, Douglas T, et al. Inflammatory responses to individual microorganisms in the lungs of children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 2011;53:425-32.

-
100. Cimon B, Symoens F, Zouhair R, et al. Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. J Med Microbiol 2001;50:367-74.
101. Vanhee LM, Symoens F, Bouchara JP, Nelis HJ, Coenye T. High-resolution genotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:1005-7.
102. Rougeron A, Giraud S, Razafimandimby B, Meis JF, Bouchara JP, Klaassen CH. Different colonization patterns of *Aspergillus terreus* in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect 2013.
103. Symoens F, Haase G, Pihet M, et al. Unusual *Aspergillus* species in patients with cystic fibrosis. Med Mycol 2010;48 Suppl 1:S10-6.
104. Cimon B, Carrere J, Vinatier JF, Chazallete JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:53-6.
105. Pihet M, Carrere J, Cimon B, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. Med Mycol 2009;47:387-97.
106. Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, et al. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. Med Mycol 2010;48 Suppl 1:S32-6.

107. Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* 2013;51:603-13.
108. Lebecque P, Leonard A, Huang D, et al. *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* and cystic fibrosis - Prevalence and risk factors. *Med Mycol* 2010;48 Suppl 1:S4-9.
109. Packeu A, Lebecque P, Rodriguez-Villalobos H, et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Exophiala* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 2012;61:1226-33.
110. Giraud S, Favennec L, Bougnoux ME, Bouchara JP. *Rasamsonia argillacea* species complex: taxonomy, pathogenesis and clinical relevance. *Future Microbiol* 2013;8:967-78.
111. Cimon B, Carrere J, Chazalotte JP, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol* 1999;37:291-3.
112. Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, et al. *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010;48:2381-6.
113. Barton RC, Borman AM, Johnson EM, et al. Isolation of the fungus *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010;48:2615-7.
114. Cimon B, Challier S, Beguin H, Carrere J, Chabasse D, Bouchara JP. Airway colonization by *Acrophialophora fusispora* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2005;43:1484-7.

115. Hernandez-Hernandez F, Frealle E, Caneiro P, et al. Prospective multicenter study of *Pneumocystis jirovecii* colonization among cystic fibrosis patients in France. J Clin Microbiol 2012;50:4107-10.
116. Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, et al. Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. Clin Microbiol Infect 2005;11:1012-5.
117. Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. J Clin Microbiol 2001;39:2717-8.
118. Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. Med Mycol 2012;50:556-60.
119. Sivam S, Sciurba FC, Lucht LA, et al. Distribution of *Pneumocystis jirovecii* in lungs from colonized COPD patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;71:24-8.
120. Matsuse H, Tsuchida T, Fukahori S, et al. Dissociation between sensitizing and colonizing fungi in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. Ann Allergy Asthma Immunol 2013;111:190-3.
121. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. Med Mycol 2010;48 Suppl 1:S88-97.
122. Horre R, Symoens F, Delhaes L, Bouchara JP. Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. Med Mycol 2010;48 Suppl 1:S1-3.

123. Bellis G, Cazès MH, Fuhrman C, et al. Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2006. Paris: Vaincre la Mucoviscidose et Institut national d'études démographiques; 2009.
124. Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis, allergic fungal sinusitis, and hypersensitivity pneumonitis. *Clin Allergy Immunol* 2002;16:449-68.
125. Knutsen AP, Slavin RG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy* 1991;9:103-18.
126. Mastella G, Rainisio M, Harms HK, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001;17:1052-3.
127. Thia LP, Balfour Lynn IM. Diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2009;10:37-42.
128. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46:327-60.
129. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* 2003;37 Suppl 3:S225-64.
130. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* 2010;137:171-6.

131. Kraemer R, Delosea N, Ballinari P, Gallati S, Cramer R. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1211-20.
132. Wojnarowski C, Eichler I, Gartner C, et al. Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1902-7.
133. Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, Kerem E. *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. *Chest* 2006;130:222-6.
134. Skov M, Hoiby N, Koch C. Itraconazole treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Allergy* 2002;57:723-8.
135. Hutcheson PS, Knutsen AP, Rejent AJ, Slavin RG. A 12-year longitudinal study of *Aspergillus* sensitivity in patients with cystic fibrosis. *Chest* 1996;110:363-6.
136. Wark P. Pathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis and an evidence-based review of azoles in treatment. *Respir Med* 2004;98:915-23.
137. Kanthan SK, Bush A, Kemp M, Buchdahl R. Factors effecting impact of *Aspergillus fumigatus* sensitization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:785-93.
138. Maiz L, Cuevas M, Quirce S, et al. Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. *Chest* 2002;121:782-8.

-
139. Milla CE, Wielinski CL, Regelman WE. Clinical significance of the recovery of *Aspergillus* species from the respiratory secretions of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:6-10.
140. Skov M, Koch C, Reimert CM, Poulsen LK. Diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in cystic fibrosis. *Allergy* 2000;55:50-8.
141. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2003;2:29-34.
142. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 2003;361:1671-6.
143. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 2003;67:471-85.
144. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117-33.
145. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *Bmj* 2000;320:1240-3.
146. Courbes enfants. Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé, 2006. (Accessed May 27, 2009, at http://www.inpes.sante.fr/50000/pdf/courbes_enfants.pdf.)
147. Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempe M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 1991;45:13-21.

148. Wang X, Dockery DW, Wypij D, Fay ME, Ferris BG, Jr. Pulmonary function between 6 and 18 years of age. *Pediatr Pulmonol* 1993;15:75-88.
149. Société Française de Microbiologie. Examen bactériologique des sécrétions bronchopulmonaires chez un patient mucoviscidosique. In: Alinéa, ed. Rémic. Paris: Vivactis plus; 2007:35-8.
150. Knudsen PK, Olesen HV, Hoiby N, et al. Differences in prevalence and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis centres in Denmark, Norway and Sweden. *J Cyst Fibros* 2009;8:135-42.
151. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: CBS; 2002.
152. Edwards LJ. Modern statistical techniques for the analysis of longitudinal data in biomedical research. *Pediatr Pulmonol* 2000;30:330-44.
153. Skov M, McKay K, Koch C, Cooper PJ. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis in an area with a high frequency of atopy. *Respir Med* 2005;99:887-93.
154. Jubin V, Ranque S, Stremler Le Bel N, Sarles J, Dubus JC. Risk factors for *Aspergillus* colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:764-71.
155. Ritz N, Ammann RA, Casaulta Aebischer C, Schoeni-Affolter F, Schoeni MH. Risk factors for allergic bronchopulmonary aspergillosis and sensitisation to *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 2005;164:577-82.

156. Langholz B, Jiao J. Computational methods for case-cohort studies. *Computational Statistics & Data Analysis* 2007;51:3737-48.
157. Kraemer R, Baldwin DN, Ammann RA, Frey U, Gallati S. Progression of pulmonary hyperinflation and trapped gas associated with genetic and environmental factors in children with cystic fibrosis. *Respir Res* 2006;7:138.
158. Nicolai T, Arleth S, Spaeth A, Bertele-Harms RM, Harms HK. Correlation of IgE antibody titer to *Aspergillus fumigatus* with decreased lung function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1990;8:12-5.
159. Baxter CG, Moore CB, Jones AM, Webb AK, Denning DW. IgE-mediated immune responses and airway detection of *Aspergillus* and *Candida* in adult cystic fibrosis. *Chest* 2013;143:1351-7.
160. de Vrankrijker AM, van der Ent CK, van Berkhout FT, et al. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1381-6.
161. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:560-6 e10.
162. Suresh Babu K, Kastelik J, Morjaria JB. Role of long term antibiotics in chronic respiratory diseases. *Respir Med* 2013;107:800-15.

163. Clement A, Tamalet A, Leroux E, Ravilly S, Fauroux B, Jais JP. Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: A double blind, placebo controlled trial. *Thorax* 2006;61:895-902.
164. Saiman L, Anstead M, Mayer-Hamblett N, et al. Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010;303:1707-15.
165. Ratjen F, Saiman L, Mayer-Hamblett N, et al. Effect of azithromycin on systemic markers of inflammation in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 2012;142:1259-66.
166. Saiman L, Mayer-Hamblett N, Anstead M, et al. Open-label, follow-on study of azithromycin in pediatric patients with CF uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatr Pulmonol* 2012;47:641-8.
167. Baxter CG, Rautemaa R, Jones AM, et al. Intravenous antibiotics reduce the presence of *Aspergillus* in adult cystic fibrosis sputum. *Thorax* 2013;68:652-7.
168. Eaton TE, Weiner Miller P, Garrett JE, Cutting GR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations: do they play a role in the aetiology of allergic bronchopulmonary aspergillosis? *Clin Exp Allergy* 2002;32:756-61.
169. Luisetti M, Pignatti PF. Genetics of idiopathic disseminated bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med* 2003;24:179-84.

-
170. Miller PW, Hamosh A, Macek M, Jr., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am J Hum Genet* 1996;59:45-51.
171. Fillaux J, Bremont F, Murris M, et al. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis* 2012;44:842-7.
172. Tran Van Ky P, Biguet J, Vaucelle T. Etude d'une fraction antigénique d'*Aspergillus fumigatus* support d'une activité catalasique. Conséquence sur le diagnostic immunologique de l'aspergillose. *Rev Immunol Ther Antimicrob* 1968;32:37-52.
173. Tran Van Ky P, Uriel J, Rose F. Caractérisation de types d'activités enzymatiques dans des extraits antigéniques d'*Aspergillus fumigatus* après électrophorèse et immunoélectrophorèse en agarose. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1966;111:161-70.
174. Bellis G, Cazes MH, Lemonnier L, Sponga M. Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2011. France: Vaincre la Mucoviscidose et Institut national d'études démographiques; 2013.
175. Corey M. Canadian Cystic Fibrosis Patient Data Registry Report - 2011. Canada: Canadian Cystic Fibrosis Foundation; 2013.
176. Millar FA, Simmonds NJ, Hodson ME. Trends in pathogens colonising the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985-2005. *J Cyst Fibros* 2009;8:386-91.

-
177. Liu JC, Modha DE, Gaillard EA. What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis? *J Cyst Fibros* 2013;12:187-93.
178. O'Driscoll BR, Powell G, Chew F, et al. Comparison of skin prick tests with specific serum immunoglobulin E in the diagnosis of fungal sensitization in patients with severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1677-83.
179. Hemmann S, Nikolaizik WH, Schoni MH, Blaser K, Cramer R. Differential IgE recognition of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens by cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis or *Aspergillus* allergy. *Eur J Immunol* 1998;28:1155-60.
180. Knutsen AP, Hutcheson PS, Slavin RG, Kurup VP. IgE antibody to *Aspergillus fumigatus* recombinant allergens in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 2004;59:198-203.
181. Delhaes L, Frealle E, Pinel C. Serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: State of the art and further challenges. *Med Mycol* 2010;48 Suppl 1:S77-87.
182. van Toorenenbergen AW. Between-laboratory quality control of automated analysis of IgG antibodies against *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74:278-81.
183. Sarfati J, Monod M, Recco P, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:279-91.

184. Skov M, Pressler T, Jensen HE, Hoiby N, Koch C. Specific IgG subclass antibody pattern to *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Thorax* 1999;54:44-50.
185. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2007;151:134-9, 9 e1.
186. Burggraeve N, Branger B, Dabadie A, Deneuille E, Rault G, Roussey M. Evolution des épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) chez des enfants atteints de mucoviscidose et dépistés à la naissance. Lien avec l'infection pulmonaire. Etude sur 40 enfants et 744 EFR. *Arch Pediatr* 2007;14:864-9.
187. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med* 1999;340:23-30.
188. de Gracia J, Mata F, Alvarez A, et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax* 2005;60:558-63.
189. Aaron SD, Vandemheen KL, Freitag A, et al. Treatment of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a randomized, placebo-controlled pilot study. *PLoS One* 2012;7:e36077.

TITLE: Assessment of *Aspergillus fumigatus* sensitisation or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis, and predictability

ABSTRACT: *Aspergillus fumigatus* (*Af*) is a ubiquitous fungus that causes a wide range of pulmonary diseases. Cystic fibrosis (CF) is one of the most common life-shortening autosomal recessive diseases in which chronic endobronchial infection contributes to progressive obstructive pulmonary disease. The literature provides scarce information about the impact of fungal infection on the pulmonary function of CF patients. At the Toulouse CF Resources and Competence Centre, details of patients with CF are entered into a database during each visit. From these data, a study was conducted to assess *Af* related-status modulating the forced expiratory volume in one second of CF patients. We have determined that *Af* may be of clinical relevance in some CF patients who do exhibit manifestations of sensitisation or persistent carriage. Secondly, we assess the putative predictive factors for CF patients to become either sensitised to or carriers of *Af*, and we proposed a tree diagram for risk calculation.

AUTEUR : Judith FILLAUX

TITRE : Evaluation de la sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* et du portage persistant comme facteurs de détérioration de la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose au CHU de Toulouse

DIRECTEUR DE THESE : Pr Jean-François MAGNAVAL

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le mardi 17 décembre 2013

RESUME : *Aspergillus fumigatus* (Af) est responsable de maladies respiratoires. La mucoviscidose est une maladie génétique fréquente, à transmission autosomique récessive au cours de laquelle les manifestations respiratoires déterminent le pronostic de la maladie. Les publications sur les infections fongiques au cours de la mucoviscidose sont rares. Au CHU de Toulouse, deux CRCM, pédiatrique et adulte, suivent les patients de la région Midi-Pyrénées. Les médecins implémentent à chaque consultation un dossier informatisé. A partir de ces données, une étude a été menée afin de déterminer si le fait de présenter des signes directs et/ou indirects de la présence d'Af, en l'absence d'ABPA, pouvait être responsable de l'altération de la fonction pulmonaire. Dans un deuxième temps, après avoir identifié deux nouvelles entités morbides, la sensibilisation à Af et le portage persistant de ce champignon, un algorithme de calcul de risque a été proposé.

MOTS-CLES : *Aspergillus fumigatus*, Mucoviscidose, sensibilisation, portage persistant

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Immunologie

Equipe MRN2i, PHARMA-Dev, UMR 152 IRD-Université
Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement
Université Paul Sabatier – Toulouse-III, Faculté des Sciences Pharmaceutiques
31062 Toulouse Cedex 9
France